

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

# **Identifikation von Zielgenen des $\beta$ -Catenin regulierten 18q21 Tumorsuppressorkandidaten ITF-2**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Bernadette Sarah Ströhle  
aus  
Ulm an der Donau  
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Kolligs
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther
	Priv. Doz. Dr. Falk Hlubek
	Priv. Doz. Dr. Michael S. Kasparek
	Prof. Dr. Stefan Endres
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst
Dekan:	Prof. Dr.med.Dr.h.c.M.Reiser, FACR,FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2013

**Meiner Familie**

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1	Deskriptive Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologische Epidemiologie.....	1
1.1.3	Stadieneinteilung und Prognose.....	2
1.2	Molekulare Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese.....	4
1.2.1	Chromosomale Instabilität (CIN).....	5
1.2.2	Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	6
1.2.3	CpG-Insel Methylierung (CIMP).....	7
1.3	basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren.....	7
1.3.1	Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2).....	10
1.3.2	Neurogenin 3 (NeuroG3).....	11
1.3.3	Atonal Homolog 8 (ATOH8).....	11
1.4	Zusammenfassung und Ziele.....	13
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>15</b>
2.1	Geräte.....	15
2.1.1	Allgemein.....	15
2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	15
2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.1.4	Klonierung/Reportergenassays.....	16
2.1.5	SDS-PAGE/Western Blot/Immunodetektion von Proteinen.....	16
2.1.6	Durchflusszytometrie.....	16
2.1.7	Zellkultur.....	16
2.2	Reagenzien.....	17
2.2.1	Allgemeine Lösungen.....	17
2.2.2	Spezielle Lösungen und Kits.....	18
2.2.2.1	RNA Extraktion/RT-PCR.....	18
2.2.2.2	Konventionelle PCR/qRT-PCR/Klonierungs-PCR.....	18
2.2.2.3	Mutations-PCR.....	18
2.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.2.2.5	Klonierung.....	19
2.2.2.6	Reportergenassays.....	20
2.2.2.7	SDS-PAGE/Western Blot/Immunodetektion von Proteinen.....	20
2.2.2.8	Co-Immunopräzipitation/Chromatin-Immunopräzipitation.....	21

---

2.2.2.9	Durchflusszytometrie.....	22
2.2.2.10	Zellkultur .....	22
2.2.2.11	DNA-Mikroarray .....	23
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.1	Isolation von RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	24
3.2	Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren.....	24
3.3	Isolation von Proteinen.....	25
3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	26
3.6	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	26
3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
3.7.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	28
3.7.2	Konventionelle PCR .....	29
3.7.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	30
3.7.4	Klonierungs-PCR .....	31
3.7.5	Mutations-PCR.....	33
3.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
3.9	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	34
3.9.1	Vektoren und Einsätze ( <i>Inserts</i> ) .....	34
3.9.2	Enzymatischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen .....	36
3.9.3	Ligation .....	36
3.9.4	Plasmidtransformation in kompetente <i>Escherichia coli</i> -Bakterien .....	36
3.10	DNA Sequenzierung nach Sanger .....	37
3.11	Reportergenassays (RGA).....	37
3.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
3.13	Western Blot.....	39
3.14	Immunodetektion von Proteinen .....	40
3.15	Co-Immunopräzipitation (Co-IP) .....	40
3.16	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	41
3.17	Zellkultur.....	43
3.17.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	43
3.17.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	44
3.17.3	Transfektion .....	44
3.17.3.1	Transfektionstechniken .....	44
3.17.3.2	Transiente Transfektion.....	46
3.17.3.3	Stabile Transfektion .....	46
3.18	Koloniebildungsassay (KBA).....	47

---

3.19	Durchflusszytometrie .....	48
3.19.1	Allgemeines Funktionsprinzip .....	48
3.19.2	Zellzyklusanalyse nach Nicoletti .....	48
3.19.3	Vorbereiten und Anfärben der Proben .....	49
3.20	DNA-Mikroarray .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
4.1	Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2B .....	51
4.1.1	Identifikation von Zielgenen .....	51
4.1.2	Eingrenzung der ITF-2B Zielgene .....	58
4.1.2.1	Literaturrecherche .....	58
4.1.2.2	qRT-PCR Validierung der Induktion durch ITF-2B .....	60
4.1.2.3	qRT-PCR Untersuchung der Induktion durch ITF-2A .....	63
4.1.2.4	Analyse der Expression der ITF-2B Zielgene im Kolon .....	65
4.1.2.5	Zusammenfassung aller untersuchten Kriterien .....	66
4.2	Charakterisierung des ATOH8 Promotors .....	67
4.2.1	Auswahl geeigneter Zelllinien für die Reporterassays .....	67
4.2.2	Identifikation von ITF-2B Bindungsstellen am ATOH8 Promotor .....	68
4.2.3	ITF-2B benötigt NeuroG3 als Interaktionspartner .....	69
4.2.3.1	Physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3 .....	70
4.2.3.2	Funktionelle Interaktion von ITF-2B und NeuroG3 .....	71
4.2.4	Identifikation von Bindungsstellen des ITF-2B/NeuroG3-Heterodimers am ATOH8 Promotor .....	72
4.2.4.1	Funktionelle Untersuchung des ATOH8 Promotors .....	72
4.2.4.2	Physikalische Untersuchung des ATOH8 Promotors .....	75
4.3	Interaktion von ATOH8 mit ITF-2B und NeuroG3 .....	77
4.3.1	Physikalische Interaktion von ATOH8 und ITF-2B .....	77
4.3.2	Funktionelle Interaktion von ATOH8 mit ITF-2B und NeuroG3 .....	77
4.4	Untersuchung der Funktion von ATOH8 .....	81
4.4.1	ATOH8 inhibiert die Koloniebildung von Kolonkarzinom-Zelllinien .....	81
4.4.2	ATOH8 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21 <sup>Cip1</sup> .....	82
4.4.3	Die Expression von ATOH8 hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus .....	83
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1	Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2B .....	85
5.2	Charakterisierung des ATOH8 Promotors .....	86
5.2.1	ITF-2B benötigt NeuroG3 als Interaktionspartner .....	87

---

5.2.2	Identifikation von Bindungsstellen des ITF-2B/NeuroG3-Heterodimers am ATOH8 Promotor .....	87
5.3	Interaktion von ITF-2B mit seinem Zielgen ATOH8 .....	88
5.4	Untersuchung der Funktion von ATOH8.....	89
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>107</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	107
8.2	Primertabellen .....	108
	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1 Deskriptive Epidemiologie

Laut der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ist das kolorektale Karzinom bei Männern weltweit das dritthäufigste Karzinom nach dem Prostata- und dem Bronchialkarzinom und bei Frauen weltweit das zweithäufigste Karzinom nach dem Mammakarzinom (Ferlay J, 2010b). In Deutschland rangiert das kolorektale Karzinom auch bei den Männern an zweiter Stelle hinter dem Prostatakarzinom (Haberland et al., 2010). Weltweit erkrankten im Jahr 2008 1.233.000 Menschen am kolorektalen Karzinom. In Deutschland lag die Neuerkrankungsrate im selben Zeitraum bei etwa 70.000, wobei Männer insgesamt etwas häufiger betroffen waren als Frauen (Ferlay J, 2010a). Das Lebenszeitrisko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms beträgt in Deutschland 7,7% für Männer und 6,5% für Frauen (Husmann, 2010), wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 67 Jahren für das männliche und 72 Jahren für das weibliche Geschlecht liegt (Bertz, 2010). Die Mortalitätsrate des kolorektalen Karzinoms wird für die Bundesrepublik altersstandardisiert mit 15,9 Männern und 9,5 Frauen pro 100.000 angegeben. In absoluten Zahlen bedeutet das, dass etwa 28.000 Patienten in Deutschland jährlich an einem kolorektalen Karzinom versterben (Ferlay J, 2010a). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde in der Bundesrepublik eine kontinuierliche Zunahme der alterstandardisierten Inzidenz, demgegenüber jedoch eine Abnahme der alterstandardisierten Mortalität beobachtet. Die Entwicklung der Inzidenz wird vorwiegend dem demographischen Wandel zugeschrieben, da sich vor allem in den höheren Altersklassen eine überproportionale Zunahme an Neuerkrankungen verzeichnen lässt (Husmann, 2010). Ein weiterer Grund für die Zunahme der Inzidenz und außerdem ein Grund für den Rückgang der Mortalität ist die Aufnahme des Koloskopiescreenings für kolorektale Karzinome in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherungen im Jahr 2002. Hierdurch werden insgesamt mehr Karzinome entdeckt, jedoch vornehmlich in frühen, gut therapierbaren Stadien (Haberland et al., 2010). Dieser positive Trend lässt sich auch bei den relativen 5-Jahres Überlebensraten beobachten, die sich seit Beginn der 1980er Jahre von 45% auf heute 60% verbessert haben (Bertz, 2010).

### 1.1.2 Ätiologische Epidemiologie

Weltweit gibt es große Unterschiede sowohl in der Inzidenz als auch in der Mortalität des kolorektalen Karzinoms. Die höchste Zahl an jährlichen Neuerkrankungen werden in Australien, Neuseeland und dem westlichen Europa verzeichnet, die niedrigsten in Afrika



und Asien (Ferlay J, 2010b). Als Hinweis auf Ernährungs- und Lebensstil bedingte Risikofaktoren dient die Beobachtung, dass Migranten aus Niedrigrisikogebieten in Hochrisikogebiete bereits nach einer Generation das gleiche Risiko haben ein kolorektales Karzinom zu entwickeln wie die Bevölkerung des Einwanderungslandes (Parkin et al., 2005). Einen gesicherten negativen Effekt auf das Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln hat der häufige Verzehr von rotem Fleisch und raffinierten Kohlenhydraten, während sich regelmäßige körperliche Aktivität und das Vermeiden von Übergewicht und übermäßigem Alkoholkonsum positiv auf das kolorektale Karzinomrisiko auswirken (Chan & Giovannucci, 2010). Der präventive Effekt von Aspirin und anderen non-steroidalen Antiphlogistika gilt als bewiesen, allerdings stehen dem Nutzen dieser Medikamente nicht zu unterschätzende Risiken in der Anwendung gegenüber (Chan & Giovannucci, 2010). Neben den Umweltfaktoren spielt vor allem die familiäre Belastung eine große Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome. Etwa 30% aller kolorektalen Karzinome können mit einer positiven Familienanamnese in Zusammenhang gebracht werden, wobei nur etwa 5% aller Fälle mit den mittlerweile gut charakterisierten Kolonkarzinomsyndromen familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), attenuierte FAP, hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom (HNPCC), multiple adenomatöse Polyposis (MAP), Peutz-Jeghers Syndrom und juveniles Polyposissyndrom assoziiert sind. Die Ätiologie der übrigen familiär gehäuften Fälle ist noch Gegenstand aktueller Forschung (Jasperson et al., 2010).

### 1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Die erste international anerkannte Klassifikation für das kolorektale Karzinom wurde 1932 von C.Dukes publiziert und ursprünglich ausschließlich für das Rektumkarzinom entwickelt (Dukes C., 1932). Heute gilt die pathologische TNM Klassifikation (pTNM) der *Union internationale contre le cancer* (UICC) als Goldstandard. Sie orientiert sich an Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasierungsgrad und wurde zuletzt 2009 aktualisiert (Tabellen 1.1-1.2) (Sobin et al., 2010; Wittekind & Meyer, 2010). Neben der Stadieneinteilung nach UICC spielen diverse histopathologische Kriterien (Tabelle 1.3) eine Rolle für die Prognose eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. Etwa 55% aller kolorektalen Karzinome sind im Rektosigmoid lokalisiert, es folgt das Zökum mit 13% und das Colon transversum mit 11% aller Karzinome. Seltener betroffen sind das Colon ascendens (9%) und das Colon descendens (6%) (Bruns & Auernhammer, 2010).

<b>T – Primärtumor</b>	
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ <sup>1</sup>
<b>T1</b>	Tumor infiltriert Submukosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert über Muscularis propria hinaus in subseröses bzw. perikolisches/perirektales Fettbindegewebe
<b>T4</b>	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen <sup>2,3</sup> und/oder perforiert das viszerale Peritoneum <b>T4a</b> Tumor perforiert viszerale Peritoneum <b>T4b</b> Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen
Anmerkungen: <sup>1</sup> Tis liegt vor wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen oder in der Lamina propria nachweisbar sind, ohne eine Ausbreitung durch die Muscularis propria in die Submukosa. <sup>2</sup> Direkte Ausbreitung in der Kategorie T4b schließt auch die mikroskopische Infiltration anderer Segmente des Kolorektums ein und für Tumoren in retroperitonealer Lokalisation die direkte Invasion anderer Organe oder Strukturen. <sup>3</sup> Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhärent ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor in Abhängigkeit von der Tiefe der Wandinfiltration als pT1-pT3 klassifiziert werden.	
<b>N - Regionäre Lymphknoten</b>	
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten <b>N1a</b> Metastasen in 1 regionärem Lymphknoten <b>N1b</b> Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten <b>N1c</b> Tumorknötchen bzw. Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten <b>N2a</b> Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten <b>N2b</b> Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
Anmerkung: Satelliten sind makroskopische oder mikroskopische Nester oder Knötchen im perikolorektalen Fettgewebe des Lymphabflussgebietes des Primärtumors ohne histologisch erkennbare Residuen eines Lymphknotens	
<b>M – Fernmetastasen</b>	
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen <b>M1a</b> Metastasen auf ein Organ beschränkt <b>M1b</b> Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tabelle 1.1 **TNM Klassifikation** (Sobin et al., 2010; Wittekind & Meyer, 2010)

UICC	TNM	Dukes	5-JÜR
Stadium 0	Tis N0 M0		>99%
Stadium I	T1-2 N0 M0	Dukes A	96%
Stadium II	T3-4 N0 M0	Dukes B	85%
Stadium III	T1-4 N1-2 M0	Dukes C	61%
Stadium IV	T1-4 N1-2 M1		9%

**Tabelle 1.2 Stadieneinteilung** (Alexander & Flasnöcker, 1999; Sobin et al., 2010; Wittekind & Meyer, 2010)

<b>G - Grading</b>	
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert
<b>R - Residualtumor</b>	
RX	Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor
<b>L - Lymphgefäßinvasion</b>	
LX	Lymphgefäßinvasion kann nicht beurteilt werden
L0	Keine Lymphgefäßinvasion
L1	Lymphgefäßinvasion
<b>V - Veneninvasion</b>	
V0	Keine Veneninvasion
V1	Mikroskopische Veneninvasion
V2	Makroskopische Veneninvasion
<b>Pn - Perineuralscheideninvasion</b>	
PnX	Perineuralscheideninvasion kann nicht beurteilt werden
Pn0	Keine Perineuralscheideninvasion
Pn1	Perineuralscheideninvasion

**Tabelle 1.3 Histopathologisches Grading** (Bruns & Auernhammer, 2010)

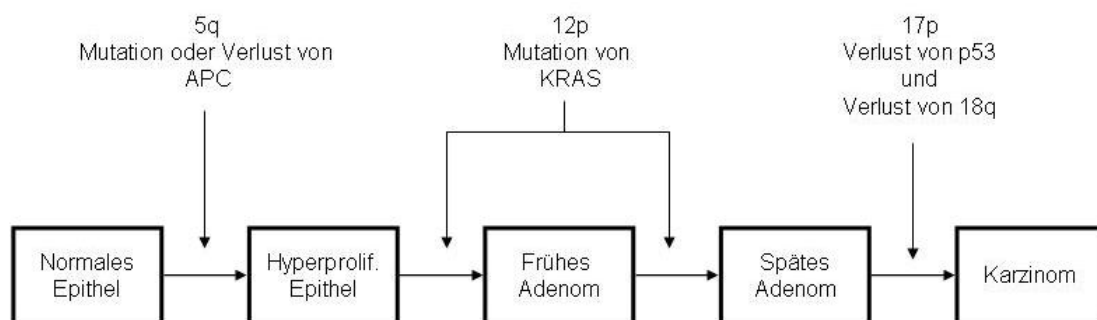
## 1.2 Molekulare Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese

1975 wurde erstmals der Begriff des Adenom-Karzinom Modells eingeführt, der beschreibt, dass sowohl sporadische als auch hereditäre kolorektale Karzinome zum größten Teil aus Adenomen hervorgehen (Muto et al., 1975). Für die Entstehung eines Karzinoms aus einem Adenom sind mehrere Schritte notwendig, wobei die genomische Instabilität eine besonders bedeutende Rolle spielt. Unter genomischer Instabilität versteht man im Wesentlichen zwei molekulare Mechanismen der Karzinomentstehung. Den Mechanismus der chromosomalen Instabilität (CIN) und den Mechanismus der Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Ein dritter Mechanismus der Tumorentstehung, der ebenfalls eine bedeutende Rolle spielt, ist die

Tumorigenese durch Hypermethylierung spezifischer CpG-Inseln im Promotorbereich verschiedener Gene (CIMP) (Boland & Goel, 2005; Ogino & Goel, 2008; Issa, 2008). Da es sich bei diesem Mechanismus um epigenetische Phänomene handelt, muss er getrennt von den genetischen Veränderungen bei der genomischen Instabilität betrachtet werden. Als Modellerkrankungen zur Untersuchung dieser molekularen Mechanismen dienen vor allem die hereditären Kolonkarzinomsyndrome FAP und HNPCC.

### 1.2.1 Chromosomale Instabilität (CIN)

CIN findet sich in etwa 65%-70% aller sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome (Pino & Chung, 2010) und wird charakterisiert durch eine erhöhte Rate an entweder Verlusten oder Zugewinnen von ganzen Chromosomen oder großen Chromosomenabschnitten in einzelnen Zellen, was zur Aneuploidie dieser Zellen führt (Lengauer et al., 1998). Die Konsequenz ist unter Anderem ein häufiger Heterozygotieverlust verschiedenster Gene. Eng gekoppelt an die Veränderungen des Karyotyps in CIN positiven Tumorzellen ist die Akkumulation einiger charakteristischer Mutationen, die zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Pino & Chung, 2010). Es waren Vogelstein und Fearon Ende der 1980er Jahre, die erstmals in der Lage waren diese charakteristischen Mutationen einzelnen Entwicklungsschritten eines Adenoms auf dem Weg zum Karzinom zuzuordnen (Fearon & Vogelstein, 1990) (Abb.1.1).



**Abbildung 1.1 Das Adenom-Karzinom Modell** (Fearon & Vogelstein, 1990; Pino & Chung, 2010)

Initiales Ereignis der kolorektalen Karzinogenese ist in den meisten Fällen der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) und damit eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges (Kinzler & Vogelstein, 1996; Bienz & Clevers, 2000). Das APC Protein spielt eine Rolle in der Zelladhäsion und Migration, der Zellzyklus- und Apoptoseregulation und in der Spindelformation und Chromosomensegregation im Rahmen der Zellteilung. Seine Hauptfunktion besteht allerdings in der Regulation des Proto-Onkogens  $\beta$ -Catenin (Rubinfeld et al., 1993; Su et al.,

1993; Kawasaki et al., 2000; Kaplan et al., 2001; Etienne-Manneville & Hall, 2003). APC bildet mit Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Casein-Kinase-1 $\alpha/\epsilon$  (CK-1 $\alpha/\epsilon$ ) und Axin einen Destruktionskomplex (Rubinfeld et al., 1996), in welchem  $\beta$ -Catenin durch die GSK-3 $\beta$  phosphoryliert wird. Anschließend kommt es zur Ubiquitinierung des  $\beta$ -Catenin und zum proteasomalen Abbau (Gumbiner, 1995). Ein Funktionsverlust des APC führt dazu, dass  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut wird und im Cytosol akkumuliert.  $\beta$ -Catenin wird dann aktiv in den Zellkern transloziert (Wu et al., 2008), interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren der *T-cell specific transcription factor/lymphoid-Enhancer-binding factor* (Tcf/LEF) Familie und reguliert die Transkription multipler Gene wie z.B. c-Myc und Cyclin D1 (Gumbiner, 1995). 50% aller kolorektalen Karzinome, die keine Mutation im APC aufweisen, besitzen eine aktivierende Mutation im  $\beta$ -Catenin Gen. In der weiteren Entwicklung kolorektaler Karzinome kommt es in über 50% aller Tumoren zu einer Aktivierung des Onkogens KRAS und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 (Kolligs et al., 2002a; Clevers, 2004; Polakis, 2007; Pino & Chung, 2010). Ein für diese Arbeit besonders wichtiges Ereignis später in der Karzinogenese am Übergang vom Adenom zum invasiven Karzinom ist der Verlust des Chromosomenabschnitts 18q21 durch *Loss of Heterozygosity* (LOH). In diesem Bereich des Chromosoms 18 ist neben einer Reihe bekannter Tumorsuppressorgene, wie *Deleted in Colon Cancer* (DCC) und *Mothers-against-Decapentaplegic-Homolog 4* (SMAD4), das Gen für den Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2) lokalisiert, welches als Zielgen von  $\beta$ -Catenin beschrieben wurde (Thiagalingam et al., 1996; Kolligs et al., 2002b).

### 1.2.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mikrosatelliten sind kurze repetitive Sequenzen, die ubiquitär im Genom zu finden sind. Häufig auftretende Deletionen oder Insertionen im Sequenzbereich solcher Mikrosatelliten werden als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Anfang der 1990er Jahre wurde MSI als neuer Weg in der Entwicklung kolorektaler Karzinome beschrieben (Ionov et al., 1993). MSI führt zu *Frameshift* (Rasterschub)-Mutationen und damit zu einem veränderten Expressionsprofil in den Tumorzellen (Boland et al., 2009). Etwa 12-15% aller kolorektalen Karzinome sind MSI-Tumoren. Die MSI-Tumoren sind im Gegensatz zu CIN-Tumoren meist diploid und weisen charakteristische klinische und pathologische Merkmale auf, wie ein gehäuftes Auftreten im proximalen Kolon und Überrepresentation gering differenzierter Adenokarzinome mit vorwiegend solid-trabekulärem oder medullärem Wachstumsmuster (Thibodeau et al., 1993; Sandler, 2006). Ursache für MSI ist ein DNA-Reparaturdefekt, wobei mittlerweile neun humane Mismatchreperaturgene beschrieben sind: hMSH2, hMSH3, hMSH4, hMSH5, hMSH6, hPMS1, hPMS2, hMLH1, hMLH3. In sporadischen mikrosatelliteninstabilen Tumoren ist der DNA-Reparaturdefekt meist auf eine

---

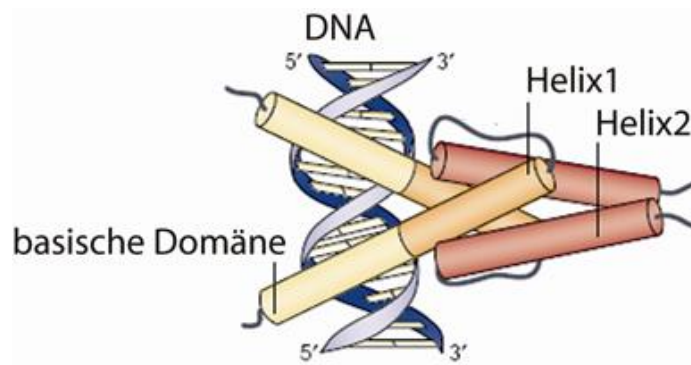
Hypermethylierung des hMLH1-Promotors zurückzuführen (Boland et al., 2009). Auf die Auswirkung solcher Hypermethylierungen im Promotorbereich eines Gens wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

### 1.2.3 CpG-Insel Methylierung (CIMP)

CpG-Inseln zeichnen sich erstens durch einen hohen Gehalt an Guanin- und Cytosinbasen und zweitens durch eine große Anzahl an CpG-Dinukleotiden aus. Methylierung findet ausschließlich am Cytosin eines CpG-Dinukleotids statt und wird als epigenetisches Phänomen bezeichnet. Epigenetische Veränderungen betreffen im Gegensatz zu CIN und MSI nicht die zugrunde liegende DNA Sequenz und sind potentiell reversibel (Boland et al., 2009). Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich eines Gens führt dazu, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können und damit das Gen nicht mehr abgelesen werden kann (Tate & Bird, 1993). 1989 wurde erstmalig die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch diesen Mechanismus beschrieben (Greger et al., 1989). Heute ist CIMP als eigener Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese etabliert, wobei nur etwa 30% aller sporadischen kolorektalen Karzinome ausschließlich auf CIMP zurückzuführen sind, in den meisten Fällen liegt eine Kombination aus CIMP und MSI vor (Portela & Esteller, 2010). Außerdem finden sich in CIMP-Tumoren sehr häufig Mutationen im KRAS- und BRAF-Signalweg (Issa, 2008). CIMP-Tumoren weisen wie MSI-Tumoren einige klinische Besonderheiten auf. Sie treten vornehmlich in höherem Alter, im proximalen Kolon und vor allem bei Frauen auf (Boland & Goel, 2005). Seit Kurzem wird angenommen, dass CIMP-Tumoren vorrangig aus serratierten Adenomen entstehen (Leggett & Whitehall, 2010).

## 1.3 basic Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren

Die Familie der *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktoren wurde 1989 erstmals beschrieben. Die namensgebende *Helix-Loop-Helix*-Domäne ist hoch konserviert und besteht aus zwei amphipathischen  $\alpha$ -Helices, die durch eine Schleife miteinander verbunden sind (Murre et al., 1989). bHLH-Transkriptionsfaktoren haben die Eigenschaft sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden (Murre et al., 1994), wobei die Dimerisierung von den HLH-Domänen vermittelt wird (Ellenberger et al., 1994; Ma et al., 1994) (Abb.1.2).



**Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines bHLH-Dimers**

Die *Helix-Loop-Helix*-Domänen zweier Transkriptionsfaktoren bilden ein Vier-Helix Bündel. Die basische Domäne umfasst zehn Aminosäuren, von denen sieben an spezifischen Erkennungssequenzen (E-Boxen) in den Promotoren der Zielgene in direkten Kontakt mit der großen Furche der DNA kommen. Aus: (Bertrand et al., 2002), nach: (Ferré-D'Amaré et al., 1993).

Im Bereich der 5'-terminalen HLH-Domäne liegt eine basische Domäne, die an spezifische Sequenzen der DNA, so genannten Ephrussi (E)-Boxen, bindet. Die basische Domäne umfasst zehn Aminosäurereste, wovon sieben in direkten Kontakt mit der DNA kommen. Die Bindung an die DNA findet im Bereich der großen Furche statt (Ellenberger et al., 1994). E-Boxen werden in regulatorischen Bereichen von Genen, wie Promotor- und Enhancerregionen, gefunden. Die kanonischen E-Boxen besitzen die Consensus-Sequenz (G/A)CANNTG(G/A) (Ephrussi et al., 1985; Voronova & Baltimore, 1990; Murre, 2005). Eine sogenannte nicht-kanonische CACGTT-E-Box wurde im Promotor des *Period2* Gens beschrieben und wird nur von bestimmten bHLH-Transkriptionsfaktoren erkannt (Yoo et al., 2005). Es gibt zwei Klassifikationssysteme für bHLH-Transkriptionsfaktoren (Massari & Murre, 2000). Murre und Mitarbeiter teilten die bHLH-Transkriptionsfaktoren 1994 aufgrund Gewebsspezifität, Fähigkeit zur Dimerbildung und DNA-Bindungsspezifität in sieben Klassen ein (Murre et al., 1994) (Tabelle 1.4). Klasse I bHLH-Proteine werden aufgrund ihrer hohen Affinität zu E-Boxen auch als E-Proteine bezeichnet. Die vier Mitglieder dieser Klasse, ITF-2, die zwei Spleißvarianten des E2A Gens, E12 und E47, und HEB werden weitestgehend ubiquitär exprimiert und bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere (Murre et al., 1994). Die Mitglieder der Klasse II werden gewebsspezifisch exprimiert. Zu ihnen gehören unter anderen Atonal-homolog, MyoD, Myogenin, Neurogenine und Gene des Acheate-Scute-Komplexes. Sie haben die Eigenschaft vornehmlich Heterodimere mit Faktoren der Klasse I zu bilden. Außerdem binden sie neben den kanonischen auch an die nicht-kanonischen E-Boxen (Murre et al., 1989). Die Klasse III wird aus Mitgliedern der Myc-Familie gebildet, die mit Proteinen der Klasse IV interagieren. Zur Klasse IV gehören Mad-, Max- und Mxi-Proteine. Die Proteine der Klasse IV bilden nicht nur mit Mitgliedern der Klasse III

Heterodimere, sondern auch innerhalb der Klasse IV (Blackwood & Eisenman, 1991; Zhao et al., 1993; Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1994). Zu den Klasse V bHLH-Proteinen gehören unter anderem die Id-Proteine 1-4. Sie besitzen keine basische Domäne und sind daher nicht in der Lage an die DNA zu binden. Sie bilden Heterodimere mit Mitgliedern der Klassen I und II und inhibieren deren Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen (Benezra et al., 1990; Ellis et al., 1990; Garrell & Modolell, 1990). Zur Klasse VI gehören HAIRY und *Enhancer of Split* (Esf) bei Drosophila und Hes/Her/Esr bei Vertebraten. Sie besitzen eine veränderte basische Domäne und fungieren ebenfalls als transkriptionelle Repressoren (Kageyama & Nakanishi, 1997; Davis & Turner, 2001). Die Klasse VII umfasst Proteine, die eine bHLH-PAS-Domäne aufweisen. PAS ist ein Akronym für die zuerst entdeckten Vertreter dieser Proteinfamilie PER-ARNT-SIM (*per-period*, *arnt-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, *sim-single minded*) (Gu et al., 2000). Die PAS-Domäne stellt eine zusätzliche Dimerisierungsdomäne dar (Jiang et al., 1996).

Klasse	Mitglieder (Auswahl)	Merkmale
I	ITF-2 E-12 E-47 HEB	<ul style="list-style-type: none"> <li>Weitestgehend ubiquitär exprimiert</li> <li>Hohe Spezifität für kanonische E-Boxen</li> <li>Bildung von Homo- und Heterodimeren</li> </ul>
II	Atonal-Homologe MyoD Myogenin Neurogenine Acheate-Scute-Komplexe	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gewebsspezifisch exprimiert</li> <li>Bindung an kanonische und nicht-kanonische E-Boxen</li> <li>Hauptsächlich Heterodimerbildung, vornehmlich mit Mitgliedern der Klasse I</li> </ul>
III	Myc TFE3 SREB-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heterodimerbildung mit Mitgliedern der Klasse IV</li> </ul>
IV	MAX MAD MXI	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heterodimerbildung innerhalb der Klasse IV und mit Mitgliedern der Klasse III</li> </ul>
V	ID 1-4 emc	<ul style="list-style-type: none"> <li>Besitzen keine DNA-Bindungsdomäne</li> <li>Heterodimerbildung mit Mitgliedern der Klasse I und II</li> </ul>
VI	HAIRY <i>Enhancer of split</i> Hes/Her/Esr	<ul style="list-style-type: none"> <li>Negative Regulatoren</li> <li>Besitzen die Aminosäure Prolin in der basischen Domäne</li> </ul>
VII	<i>Single minded</i> HIF-1 $\alpha$ CLOCK	<ul style="list-style-type: none"> <li>Besitzen bHLH-PAS Domäne</li> <li>Bindung an nicht-kanonische E-Boxen</li> </ul>

**Tabelle 1.4 Klassifikation der bHLH-Transkriptionsfaktoren nach Murre 1994** (Quellen siehe Text)



2000 wurde von Atchley et al. eine neue Einteilung basierend auf Aminosäuresequenzen und evolutionärer Verwandtschaft vorgeschlagen, um der immer größer werdenden Flut an neuen bHLH-Transkriptionsfaktoren gerecht zu werden (Atchley & Fitch, 1997). Im Weiteren werden die drei bHLH-Transkriptionsfaktoren Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2), Neurogenin 3 (NeuroG3) und *Atonal Homolog 8* (ATOH8) vorgestellt, die für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

### 1.3.1 Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2)

Henthorn und Mitarbeiter entdeckten 1990 einen bHLH-Transkriptionsfaktor, der die Fähigkeit hat an das  $\mu$ -E5/ $\kappa$ -E2 Motiv in Enhancerregionen von Immunglobulinen zu binden, und nannten ihn daher Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2) (Henthorn et al., 1990). Transkriptionsfaktor 4 (TCF4), SEF2 und E2-2 sind weitere Namen für ITF-2. ITF-2 ist ein Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktor und spielt als solcher eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten (Corneliussen et al., 1991; Murre, 2005; Cisse et al., 2008). Alle Klasse I bHLH-Proteine besitzen neben der HLH-Domäne und der basischen Domäne zwei weitere hochkonservierte Sequenzabschnitte, die dazu dienen, Koaktivator- oder Korepressorkomplexe zu rekrutieren und als Aktivierungsdomäne 1 (AD1) und 2 (AD2) bezeichnet werden (Aronheim et al., 1993; Quong et al., 1993; Massari et al., 1996). Es sind drei Spleißvarianten von ITF-2 bekannt, namentlich ITF-2A, -2B und -2D, die sich in ihrer aminoterminalen Sequenz unterscheiden. ITF-2A und -2D sind trunkierte Varianten von ITF-2B, denen aufgrund der verkürzten Sequenz am Aminoterminus die AD1 fehlt, und die daher ein schwächeres transkriptionelles Aktivierungspotential aufweisen (Herbst & Kolligs, 2008). Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, beziehen sich auf die Isoform ITF-2B, da diese 2002 als Zielgen des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges identifiziert werden konnte, der in der Mehrheit der Fälle bereits früh in der kolorektalen Karzinogenese durch eine Mutation im APC-Gen dereguliert ist (Kolligs et al., 2002b). Das Gen für ITF-2 liegt auf dem Chromosomenabschnitt 18q21, welcher im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese am Übergang vom Adenom zum Karzinom regelmäßig aufgrund von LOH verloren geht (Abb. 1.1) (Vogelstein & Kinzler, 2002). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ITF-2 in der Lage ist durch die p53 unabhängige Induktion der Transkription des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup> in Kolonkarzinom-Zelllinien einen Zellzyklusarrest zu induzieren und die Zellen für *Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand* (TRAIL)-induzierte Apoptose zu sensitivieren (Herbst et al., 2009a).

### 1.3.2 Neurogenin 3 (NeuroG3)

Zur Familie der Neurogenine gehören die Proteine Neurogenin 1, 2 und 3, welche als Atonal-Homologe alle der Klasse II der bHLH-Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden können. Sie wurden 1996 erstmalig beschrieben, aufgrund ihrer Rolle in der Determinierung neuronalen Gewebes während der Embryogenese (Ma et al., 1996; Sommer et al., 1996). NeuroG3 hat darüber hinaus eine bedeutende Rolle bei der Determinierung von Vorläuferzellen während der Entstehung des endokrinen Pankreas und bei der Entwicklung großer Teile des enteroendokrinen Systems (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002; Lee et al., 2002) und steht dabei unter der Kontrolle des Notch-Signalweges (Apelqvist et al., 1999). Die Bedeutung von NeuroG3 wird ersichtlich aus der Tatsache, dass NeuroG3-defiziente Mäuse keinerlei Langerhansinseln und nur sehr wenige enteroendokrine Zellen entwickeln und kurz nach der Geburt versterben (Gradwohl et al., 2000; Lee et al., 2002). NeuroG3 reguliert als Transkriptionsfaktor direkt die Expression von *neurogenic differentiation 1* (NeuroD1), *paired box gene 4* (Pax4), *NK2 homeobox 2* (Nkx2-2), *insulinoma associated 1* (IA-1) und *Mouse Atonal Homolog 6* (MATH6) (Huang et al., 2000; Smith et al., 2003; Watada et al., 2003; Mellitzer et al., 2006; Lynn et al., 2008; Pujadas et al., 2011). Besonders hervorgehoben werden soll die Regulation von MATH6 durch NeuroG3, bei welchem es sich um das Maus-Ortholog des nachfolgend näher beschriebenen *Atonal Homolog 8* (ATOH8) handelt.

### 1.3.3 Atonal Homolog 8 (ATOH8)

ATOH8, auch *Human Atonal Homolog 6* (HATH6) genannt, ist ein bisher nur wenig untersuchter bHLH-Transkriptionsfaktor der Klasse II. Die meisten Publikationen beziehen sich auf Proteinebene auf das Maus-Ortholog MATH6. Allerdings weisen MATH6 und ATOH8 in ihrer bHLH-Domäne eine 100%ige und insgesamt eine 88%ige Homologie auf, sodass Rückschlüsse von der Maus auf den Menschen möglich erscheinen (Abb.1.3). MATH6 ist in der Embryogenese neuronalen Gewebes in der Lage, die Neurogenese zu fördern, während es die Gliagenese hemmt (Inoue et al., 2001). Desweiteren wurde MATH6 eine Rolle in der Podozytendifferenzierung während der Nierenentwicklung zugeschrieben und es wurde als wichtiger Faktor in der embryonalen Pankreasentwicklung identifiziert (Ross et al., 2006; Lynn et al., 2008). Untersuchungen am Zebrafisch zeigten außerdem, dass ATOH8 einen wichtigen Differenzierungsfaktor für Retina und Skelettmuskel darstellt (Yao et al., 2010). Die Beobachtung, dass MATH6<sup>-/-</sup> Mäuse bereits früh in der Embryogenese, wahrscheinlich um den Zeitpunkt der Gastrulation, versterben, lässt vermuten, dass MATH6 eine bedeutende Rolle in der frühen Entwicklungsphase verschiedenster Organe spielt (Lynn et al., 2008).

Math6	MKHIPVLEDGPWKTVCVKELNGLKKLKRKGKEPVRRANGYKTFRLDLEAPELGATVSTTAAT	62
Atoh8	MKHIPVLEDGPWKTVCVKELNGLKKLKRKGKEPARRANGYKTFRLDLEAPEPRAV-----AT	57
Math6	NGLRDRT---QPFPIATPVPASVAPAVPPGGGTDTAREFRGIRAPEVSDARKRGFALGTVGP	121
Atoh8	NGLRDRTHRLQPVPVPVPVPVPVAPAVPPRGGTDTAGERGGSRAPEVSDARKRCFALGAVGP	119
Math6	GLPTPPPPP--ASQSLAPGDPEAHSFREQALRPRILLCAPPARPTQSAPLAPPAAPQESPVR	181
ATOH8	GLPTPPPPPPAPQSQAPGGPEAQPFREPGLRPRILLCAPPARPAPSAP-PAPPAPPESTVR	180
Math6	PAPPTRPGESSYSSISHVIYNNHPDSSASPRKRPGEATAASTEIKAL <b>QQTRLLANARERTR</b>	243
Atoh8	PAPPTRPGESSYSSISHVIYNNHQDSSASPRKRPGEATAASSEIKAL <b>QQTRLLANARERTR</b>	242
Math6	<b>VHTISAAFEALRKQVPCYSYGQKLSKLAILRIACNYILSLARLADLDYSADHSNLSFSECVQ</b>	305
Atoh8	<b>VHTISAAFEALRKQVPCYSYGQKLSKLAILRIACNYILSLARLADLDYSADHSNLSFSECVQ</b>	304
Math6	RCTRTLQAEGRAKKRKE	322
Atoh8	RCTRTLQAEGRAKKRKE	321

**Abbildung 1.3 Vergleich Aminosäuresequenzen Math6 und Atoh8**

Homologe Bereiche sind grau hinterlegt. Die bHLH-Domänen sind fettgedruckt dargestellt.

## 1.4 Zusammenfassung und Ziele

Das kolorektale Karzinom ist in der Bundesrepublik die dritthäufigste Krebserkrankung und führt jährlich zu etwa 28.000 Todesfällen (Ferlay J, 2010a). Im Wesentlichen werden für die kolorektale Karzinogenese drei molekulare Mechanismen verantwortlich gemacht, wobei der größte Teil aller sporadischen Karzinome auf die chromosomale Instabilität (CIN) zurückgeführt werden kann (Boland & Goel, 2005; Ogino & Goel, 2008; Issa, 2008). Neben typischen Veränderungen im Karyotyp kommt es bei der CIN zu einer Akkumulation von Mutationen, die zu einer Entartung anfänglich gutartiger Adenome zu letztendlich invasiven Karzinomen führt (Pino & Chung, 2010). Initiales Ereignis in dieser Adenom-Karzinom-Sequenz ist häufig eine Mutation im APC-Gen, die zur Deregulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges und einer vermehrten Expression von Zielgenen des Onkogens  $\beta$ -Catenin führt (Kinzler & Vogelstein, 1996; Bienz & Clevers, 2000). Da  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle in der Regeneration und Homöostase des Darmepithels spielt, ist es trotz seiner Funktion als Onkogen in der kolorektalen Karzinogenese als therapeutische Zielstruktur ungeeignet (Peifer, 1993). Aus diesem Grund untersucht unsere Arbeitsgruppe Zielgene von  $\beta$ -Catenin in Bezug auf ihre Funktion in der Karzinogenese und eventuelles therapeutisches Potential. Ein solches Zielgen von  $\beta$ -Catenin ist der bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2B (Kolligs et al., 2002b). Das Gen für ITF-2B liegt auf dem Chromosomenabschnitt 18q21. Auf diesem Chromosomenabschnitt finden sich neben ITF-2B eine Reihe weiterer Tumorsuppressorgene (Thiagalingam et al., 1996). Der Chromosomenabschnitt 18q21 geht in der Adenom-Karzinom-Sequenz häufig am Übergang vom späten Adenom zum invasiven Karzinom verloren (Vogelstein & Kinzler, 2002). Welcher der Tumorsuppressorkandidaten auf diesem Chromosomenabschnitt allerdings verantwortlich ist für die Tumorprogression nach Verlust von 18q21 ist bis heute ungeklärt (Kikuchi-Yanoshita et al., 1992; Thiagalingam et al., 1996; Mehlen & Fearon, 2004; Popat & Houlston, 2005; Castets et al., 2012). Auch für ITF-2B konnte ein Expressionsverlust am Übergang vom Adenom zum Karzinom gezeigt werden. Darüber hinaus ist ITF-2B in der Lage, in Kolonkarzinom-Zelllinien über eine p53-unabhängige Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup> einen Zellzyklusarrest zu induzieren und Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren (Herbst et al., 2009a). ITF-2B könnte daher ein neues Tumorsuppressorgen der kolorektalen Karzinogenese sein, dessen Verlust maßgeblich die Progression von späten Adenomen zu Karzinomen beeinflusst. Um die potentielle Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B besser zu verstehen, wurden folgende Ziele für diese Arbeit formuliert:

1. Identifikation von Genen, deren Expression durch ITF-2B induziert wird.

- 
2. Auswahl eines dieser Gene, das in Bezug auf die potentielle Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B eine vermittelnde Funktion haben könnte.
  3. Charakterisierung des Promotors dieses Gens, zur Identifikation der ITF-2B Bindungsstellen.
  4. Untersuchung der Funktion des ausgewählten Gens insbesondere in Bezug auf Apoptose, Proliferation und Zellzyklusregulation.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Allgemein

- Tischzentrifuge „miniSpin“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Kühlzentrifuge „Centrifuge 5417R“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge „Rotina 46R“, A.Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
- Vortexzentrifuge „Centrifuge & Vortex“, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Vortexzentrifuge „Centrifuge & Vortex CM-70M.09“, ELMI Ltd., Riga, Lettland
- Vortexer „Vortex Genie™“, Bender & Hobein AG, Bruchsal Deutschland
- Vortexer „Vortex Mixer VM-300“, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Schüttler „SHAKER DRS-R“, ELMI Ltd., Riga, Lettland
- Schüttler „KS 15A control“, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
- Wasserbad „Modell 1003“, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
- Wasserbad „U3“, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
- Heizblock „Techne DRI-Block® DB 2A“, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Großbritannien
- Waage „Modell 2254“, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Waage „EW4200-2NM“, Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
- Magnetrührer „COMBIMAG RCO“, ELMI Ltd., Riga, Lettland
- Photometer „Ultrospec 3100pro“, GE Healthcare, München, Deutschland
- Sonopuls „HD2070“, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
- Autoklaviergerät „Wolf Autoclave“, Wolf Laboratories Limited, Packlington, USA
- Wasserfiltrationssystem „Milli-Q Advantage A10 System“, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland

#### 2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

- qRT-PCR-Gerät „realplex® Mastercycler egradient S“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- qRT-PCR-Gerät „Corbett Rotorgene RG-3000“, Qiagen, Hilden, Deutschland
- PCR-Gerät „Corbett CG1-96 Palmcycler“, Qiagen, Hilden, Deutschland
- PCR-Gerät „PTC-200 Thermo Cycler“, MJ Research Inc., Watham, USA
- DNA/RNA UV-Cleaner „UVC/T-M-AR“, G.Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
- Heat Sealer „5390 0000.024“, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

- Gelkammer „WIDE MINI-SUB® Cell GT“, BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
- Stromgerät „PowerPac 200“, BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
- UV-Kamera „Multi Doc-It Transluminator M-20“, UVP Ltd., Cambridge, Großbritannien

### 2.1.4 Klonierung/Reportergenassays

- Brutschrank „Plus II Incubator“, Weiss-Gallenkamp, Leighborough, Großbritannien
- Luminometer „Orion II Microplate Luminometer“, Berthold Detection Systems GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Microplate Lesegerät „Easy Reader SF Plus“, SLT Labinstruments,/Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
- Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 135 TV“, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland

### 2.1.5 SDS-PAGE/Western Blot/Immunodetektion von Proteinen

- SDS Page Zubehör „Mini-Protean Tetra Electrophoresis System“, BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
- Blotting Zubehör „Mini Trans-Blot Cell“, BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
- Stromgerät „PowerPac 300“, BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
- Entwicklungsgerät „CURIX 60“, Agfa-Gevaert Gruppe, München, Deutschland

### 2.1.6 Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer „FACS Calibur flow cytometer“, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

### 2.1.7 Zellkultur

- Sicherheitswerkbank „Heraeus HERAsafe“, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co.KG, Bonn, Deutschland

- Brutschrank „Heraeus HERAccl 240“, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co.KG, Bonn, Deutschland
- Lichtmikroskop „IX50-S8F“, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- Neubauer Zählkammer, GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

## 2.2 Reagenzien

### 2.2.1 Allgemeine Lösungen

Chemikalie	Firma	Katalognummer
Acryl/Bisacryl Mix 29:1 (30%)	Biorad	161-0156
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	A3678
Bromophenol Blau Natriumsalz	Sigma-Aldrich	B8026
Chloroform	Sigma-Aldrich	C2432-25ML
Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Carl Roth	P030.1
DEPC (DNase, RNase freies) Wasser	Invitrogen	10977-035
EDTA	Sigma-Aldrich	E5134
Essigsäureanhydrid	Carl Roth	4483.2
Ethanol	Carl Roth	9065.1
Glycin	Carl Roth	3908.2
Isopropanol	Carl Roth	9866.1
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth	2189.2
Methanol	Carl Roth	8388.5
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth	6779.2
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich	S7277
Natriumchlorid	Carl Roth	9265.2
Natriumdihydrogenphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth	T879.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	2326.2
Salzsäure (HCL)	Sigma-Aldrich	30721
TEMED	Carl Roth	2367.2
Trisma Base	Sigma-Aldrich	T3253
Tween®	Carl Roth	9172.2
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	M3148
2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	Sigma-Aldrich	N1127



## 2.2.2 Spezielle Lösungen und Kits

### 2.2.2.1 RNA Extraktion/RT-PCR

Chemikalie/Kit	Firma	Katalognummer
TriFast™ Reagent	PeqLab	30-2010
SuperScript™ First Strand Synthesis System	Invitrogen	11904-018

### 2.2.2.2 Konventionelle PCR/qRT-PCR/Klonierungs-PCR

Chemikalie/Kit	Firma	Katalognummer
HotStarTaq® DNA Polymerase	Qiagen	203205
Phusion® HotStart DNA Polymerase	Finnzymes	F-540L
Paq5000™ DNA Polymerase	Agilent	600684
dNTP Mix 10mM	PeqLab	20-3011
SYBR® Green I	Invitrogen	S7563
Oligonukleotide	Metabion	s. Anhang

### 2.2.2.3 Mutations-PCR

Chemikalie/Kit	Firma	Katalognummer
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent	200523-5
Oligonukleotide	Metabion	s. Anhang

### 2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Chemikalie/Kit/Rezept	Firma	Katalognummer
Agarose	Biozym	84004
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	E1510-10ML
O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas	SM1343
6x Orange Loading DNA Loading Dye	Fermentas	R0631
NucleoSpin® Extract II	Machery-Nagel	740609.250
50xTAE Puffer :		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 242g Trisma Base</li> <li>• 57,1mL Essigsäureanhydrid</li> <li>• 100mL 0,5M EDTA pH 8,0</li> <li>• ad 1000mL gefiltertes Wasser</li> </ul>		

### 2.2.2.5 Klonierung

Chemikalie/Kit/Rezept	Firma	Katalognummer
T4-DNA-Ligase	Fermentas	EL0011
pUC 19 DNA	Invitrogen	15364-011
pGL3-Basic Vektor	Promega	E1751
pcDNA3.1™-Vektor	Invitrogen	V79020
pRTS1-Vektor	(Bornkamm et al., 2005)	
pRTS1/ITF2B-HA	(Herbst et al., 2009a)	
pcDNA3/ITF2B-HA	(Herbst et al., 2009a)	
pcDNA3/ATOH8-3xFLAG	AG Kolligs, LMU München	
pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG	AG Kolligs, LMU München	
pcDNA3/HATH1-3xFLAG	AG Kolligs, LMU München	
pGL3-Basic/Cip1 K	(Herbst et al., 2009a)	
μE5-TATA Reporter Plasmid	(Herbst & Kolligs, 2008)	
artifizielles Promotorkonstrukt pE7-βA-luc	(Akazawa et al., 1995)	
Konstitutiv aktives β-Galaktosidase Reporter Plasmid pCH110	Amersham	
Human Bacterial Artificial Chromosome ATOH8 mit Chloramphenicolresistenz	imaGenes	RPCIB 753B16613Q
Full Length Clone ATOH8 mit Chloramphenicolresistenz	imaGenes	IRAL p962E2262Q
Full Length Clone NeuroG3 mit Kanamycinresistenz	imaGenes	IRCM p5012A0915D
SOB-Medium	Carl Roth	AE27.1
SOC Medium:		
• SOB-Medium		
• 20mM Glucose		
Subcloning Efficiency™ DH5α™ competent E.coli	Invitrogen	18265-017
LB (Lennox) Agar	Carl Roth	X965.1
LB Broth Base powder	Invitrogen	12780-052
Ampicillin Natriumsulfat	Carl Roth	K029.1
Chloramphenicol	Carl Roth	3886.2
Kanamycinsulfat	Carl Roth	T832.1
Glycerin ROTIPURAN®	Carl Roth	3783.1
HiYield® Plasmid Mini Kit	SLG	30HYPD100
EcoRI	Fermentas	ER 0271
BamHI	Fermentas	ER 0051
MluI	Fermentas	ER 0561

XhoI	Fermentas	ER 0691
XbaI	Fermentas	ER 0681
SfiI	Fermentas	ER 1821

### 2.2.2.6 Reporterassays

Chemikalie/Kit/Rezept	Firma	Katalognummer
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega	E4030
2x-β-Galaktosidase Puffer:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 120mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• 80mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• 2mM MgCl</li> <li>• 100mM 2-Mercaptoethanol</li> <li>• 133mg/mL Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid</li> </ul>		

### 2.2.2.7 SDS-PAGE/Western Blot/Immunodetektion von Proteinen

Chemikalie/Kit	Firma	Katalognummer
Anti-HA High Affinity Antibody	Roche	11867423001
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 Antibody	Sigma-Aldrich	F1804
Monoclonal Mouse Anti-Actin	MPBiomedicals	691001
ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody	GE Healthcare	NA 931 V
Goat-anti-rat-IgG-HRP	Santa Cruz	Sc-2006
BSA (Rinderserum Albumin)	Sigma-Aldrich	A9418
Proteinassay Reagenz	Biorad	500-0006
Super Signal® WestDura	ThermoScientific	34075
Super Signal® WestPico	ThermoScientific	34077
Fixierkonzentrat Adefo GV-60	Adefo	05222
Entwicklerkonzentrat Part 1 + 2	Adefo	23036
Precision Plus Protein™ Standards All Blue	Biorad	161-0373
Bromophenol Blue Sodium Salt	Sigma-Aldrich	B-8026
Proteaseinhibitor Cocktail Set	Calbiochem	539131
Benzonase® Nuclease	Novagen	70746
Milchpulver	Biorad	170-6404

## Rezepte

## Sammelgel (5%):

- 3,4mL gefiltertes Wasser
- 830µL 30% Acryl/Bisacrylamid Mix 29:1
- 630µL 1,5M Tris pH 6,8
- 50µL SDS 10%
- 50µL Ammoniumpersulfat
- 5µL TEMED

## Trenngel (10%):

- 5,9mL gefiltertes Wasser
- 5,0mL 30% Acryl/Bisacrylamid Mix 29:1
- 3,8mL 1,5M Tris pH 8,8
- 150µL SDS 10%
- 150µL Ammoniumpersulfat
- 6µL TEMED

## SDS PAGE Laufpuffer (10x):

- 0,25M Trisma Base
- 1,92M Glycin
- 1% SDS
- ad 1000mL gefiltertes Wasser

## Transferpuffer:

- 1M Trisma Base pH 8,0
- 3M Natriumacetat pH 8,0
- 0,5M EDTA pH 7,4
- 10% SDS
- 20% v/v Methanol
- ad 2000mL gefiltertes Wasser

## TBS Stammlösung (25x):

- 60g Trisma Base
- 200g Natriumchlorid
- 7,9mL 12N Salzsäure
- ad 1000mL gefiltertes Wasser

## TBST (1x):

- 1x TBS
- 0,2% Tween

## Blocking.Lösung:

2% bzw 5% Trockenmilchpulver in  
1xTBST

## Lämmli-Puffer (2x):

- 125 mM Tris pH 6,8
- 4% SDS
- Bromophenol Blau
- 20% DTT

## 2.2.2.8 Co-Immunopräzipitation/Chromatin-Immunopräzipitation

Chemikalie/Kit/Rezept	Firma	Katalognummer
Formaldehyd	Sigma-Aldrich	F8775
Protein A/G Agarose Beads	Santa Cruz	sc-2003
Sonicated Salmon Sperm DNA	Stratagene	201190-81
HA tag antibody-ChIP Grade	Abcam	ab9110
Anti-Acetyl-Histon H3	Upstate	06599
Anti-Gal4 Antikörper	Santa Cruz	sc-577
CoIP-Lysepuffer:		
• PBS		
• 0,25% Triton X-100		
• 1:100 Proteasinh inhibitor complete		

## ChIP FA Lyse Puffer (50mL Stock):

• 50mM HEPES-KOH 1M pH 7,5	Sigma-Aldrich	H7006
• 140mM NaCl 5M		
• 1mM EDTA 0,5M pH 8,0		
• 1% Triton X-100 20%	Roche	11332481001
• 0,1% Sodium Deoxycholat 10%	Sigma-Aldrich	D5670
• 0,1% SDS 20%		
• 1:100 Proteaseinhibitor complete	Calbiochem	539131

## ChIP Dilution Puffer (50mL Stock):

- 1% Triton X-100 20%
- 2mM EDTA 0,5M pH 8,0
- 150mM NaCl 5M
- 20mM Tris-HCL 1M pH 8,0
- 1:100 Proteaseinhibitor complete

## ChIP Wash Puffer (500mL Stock):

- 0,1% SDS 20%
- 1% Triton X-100 20%
- 2mM EDTA 0,5M pH 8,0
- 150mM NaCl 5M
- 20mM Tris-HCL 1M pH 8,0

## ChIP Final Wash Puffer (500mL Stock):

- 0,1% SDS 20%
- 1% Triton X-100 20%
- 2mM EDTA 0,5M pH 8,0
- 500mM NaCl 5M
- 20mM Tris-HCL 1M pH 8,0

## ChIP Elution Puffer (10mL Stock):

• 1% SDS 20%		
• 100mM NaHCO <sub>3</sub> 1M		
• 10 µL Proteinase K (10mg/mL)	Roche	03115836001

**2.2.2.9 Durchflusszytometrie**

Chemikalie/Kit/Rezept	Firma	Katalognummer
Nicoletti-Puffer:		
• 0,1% Triton X-100	Roche	11332481001
• 50 µg/mL Propidiumjodid	Sigma-Aldrich	P4170
• 0,1% tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Carl Roth	3580

**2.2.2.10 Zellkultur**

Chemikalie/Kit	Firma	Katalognummer
DMEM High Glucose (4,5g/L) with L-Glutamine	PAA	E15-810

Dulbecco's PBS without Mg + Ca	PAA	H15-002
Fetal Bovine Serum "Gold"	PAA	A15-151
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010
Trypsin EDTA	PAA	L11-004
Opti-MEM® I reduced serum medium (1x)	Invitrogen	31985-047
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650
Polythylenimin	Polysciences	23966-2
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen	11668-019
G418-Sulphate	PAA	P02-012
Hygromycin B	PAA	P02-015
Doxycyclin	Sigma-Aldrich	44577
Methylenblau	Carl Roth	A514.1

#### Zelllinien

DLD1/ITF-2B-HA Klon B1	(Herbst et al., 2009a)
DLD1/ITF-2A-HA	(Herbst et al., 2009b)
SW480/ITF-2B-HA Klon C	(Herbst et al., 2009a)
HCT116/ITF-2A-HA	(Herbst et al., 2009b)

#### 2.2.2.11 DNA-Mikroarray

Mikroarray-Set	Firma	Katalognummer
Human Genome U133 Set	Affymetrix	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Human Genome U133A Array</li> <li>Human Genome U133B Array</li> </ul>		510681 510682

## 3 Methoden

### 3.1 Isolation von RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

(Chomczynski & Sacchi, 1987)

Gesamt RNA wurde aus Zellen und Gewebe durch die Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung von *TriFast Reagent* (Peqlab, Erlangen) gewonnen. *TriFast* ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die Zelllyse, RNase-Inaktivierung und RNA-Stabilisierung in einem Schritt ermöglicht. Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden diese in 10cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) kultiviert, einmalig mit 5mL PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und danach in 1mL *TriFast* abgekratzt und aufgenommen. Gewebe wurde in 1mL *TriFast* pro 1g Gewebe homogenisiert (Sonopuls „HD2070“, Bandelin Electronic, Berlin), die anschließende Behandlung war für Zell- und Gewebesuspensionen dieselbe. Die Proben wurden 5min bei RT inkubiert, um eine vollständige Zelllyse zu gewährleisten, dann wurde pro 1mL *TriFast* 200µL reines Chloroform (Sigma-Aldrich, München) hinzugegeben, geschüttelt, nochmals für 3min bei RT inkubiert und dann zentrifugiert (15min, 12.000xg, 4°C). Durch die Zentrifugation entstanden 3 Phasen: eine obere wässrige Phase mit RNA, eine weiße Zwischenphase und eine untere organische Phase mit DNA und Proteinen. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles 1,5mL Gefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5mL Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) pro 1mL *TriFast* präzipitiert. Für eine vollständige Fällung wurden die Proben nach kurzem Schwenken 10min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (10min, 12.000xg, 4°C). Um Isopropanolreste und Salze zu entfernen, wurde das Pellet nach Abnehmen des Überstandes mit 1mL eiskaltem Ethanol 75% (Carl Roth, Karlsruhe) gewaschen und nochmals zentrifugiert (5min, 7.500xg, 4°C). Das Pellet wurde abschließend luftgetrocknet und in 50-100µL DEPC-Wasser (Invitrogen, Darmstadt) aufgenommen. Die Proben wurden bei 4°C über Nacht gelagert, um den Lösungsvorgang der RNA zu unterstützen, anschließend wurde die Konzentration und Reinheit durch photometrische Messung bestimmt (3.4) und die Proben bei -80°C eingefroren.

### 3.2 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren

(Eickbush & Moudrianakis, 1978)

Die Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren diente der Entfernung von störendem Protein und Salzen und schloss sich meist an eine Phenol-Chloroform Extraktion (3.1) an. Die Nukleinsäurelösung wurde mit 10% Volumen K<sup>+</sup>-Acetat 3M pH 5,5 (P3 Puffer, Quiagen,

Hilden) und 300% Volumen reinem Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt, mindestens 15min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15min, 12.000xg, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem Ethanol 70% (Carl Roth, Karlsruhe) gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet 1-5min luftgetrocknet und in einer der Pelletgröße angemessenen Menge DEPC-Wasser (Invitrogen, Darmstadt) aufgenommen. Um das Lösen des Pellets zu unterstützen, wurden die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren photometrisch bestimmt (3.4). Die Lagerung erfolgte bei -80°C für RNA, -20°C für genomische DNA und +4°C für Plasmid-DNA.

### 3.3 Isolation von Proteinen

Um Proteine aus Zellen zu isolieren wurden diese einmalig mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen, in einer der Größe der Zellkulturschale angemessenen Menge an PBS abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5min, 5.000xg, 4°C) und in 1xReporter-Lyse Puffer (Promega, Mannheim) mit 1% Volumen Proteaseinhibitor complete (Calbiochem, Darmstadt) resuspendiert. Um das Aufschließen der Zellen zu erleichtern, wurde ein Gefrier-Tau Schritt eingeführt. Anschließend wurden 0,5µL Benzonase (Novagen, Darmstadt) zugegeben und 15min bei RT inkubiert, um noch vorhandene Nukleinsäuren zu spalten. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch (3.5) bestimmt und die Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

### 3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(Sambrook et al., 1989)

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Lichtabsorption bei 260nm und 320nm und die Überprüfung der Reinheit durch Bestimmung der Lichtabsorption bei 280nm (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, München). Dem liegt zugrunde, dass die Absorptionsmaxima von DNA und RNA aufgrund der Purin- und Pyrimidinringe bei 260nm liegen, während Proteine aufgrund ihrer aromatischen Seitenketten ein Absorptionsmaximum bei 280nm haben. Als Parameter für die Reinheit der Nukleinsäure gilt das Verhältnis der Absorption bei 260nm und bei 280nm, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,0 als optimal angesehen werden. Die Konzentration  $c$  (a) und die Reinheit  $R$  (b) der Nukleinsäuren werden nach folgenden Formeln berechnet:

$$(a) \quad c = (OD_{260} - OD_{320}) \times \epsilon \times f$$

$$(b) \quad R = OD_{260}/OD_{280}$$



Wobei gilt:  $\epsilon = 50\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (DNA)  
 $\epsilon = 40\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (RNA)  
 $f$  = Verdünnungsfaktor

### 3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(Bradford, 1976; Compton & Jones, 1985)

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Bradford Methode. Der verwendete Triphenylmethanfarbstoff Comassie-Blau (Proteinassay-Reagenz, Biorad, München) bildet in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Der ungebundene Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 470nm, welches sich bei Komplexbildung mit Proteinen zu 595nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595nm kann gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen und daraus die Konzentration der Proteine in Lösung berechnet werden. Zur Kalibrierung wurde eine Eichgerade durch photometrische Messung aufsteigender Konzentrationen (0, 2, 4, 6 und 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) von Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich, München) in 1:5 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünntem Farbstoff erstellt. 2 $\mu\text{L}$  der Proteinproben wurden in 1mL verdünntem Farbstoff gelöst und es wurde photometrisch die Absorption bei 595nm gemessen und anhand der Eichgeraden die Konzentration berechnet.

### 3.6 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

(Loh et al., 1989)

Die RT-PCR dient der Synthese von *complementary DNA* (cDNA) und bedient sich eines retroviralen Enzyms namens reverse Transkriptase, das in der Lage ist RNA abhängig DNA zu synthetisieren. Für diese Arbeit wurde das *SuperScript™ First Strand Synthesis System Kit* (Invitrogen, Darmstadt) verwendet, welches eine modifizierte *Moloney murine leukemia virus* RT (MMLV-RT) beinhaltet. Die Besonderheit dieses modifizierten Enzyms liegt darin, dass es höhere Temperaturen verträgt als herkömmliche MMLV-RTs, wodurch Sekundärstrukturen in der RNA effizient aufgelöst werden können. Außerdem besitzt es keine intrinsische RNase H-Aktivität mehr, sodass deutlich längere Transkripte möglich werden. Die RT-PCR lässt sich in folgende Schritte gliedern:

- DNase I Verdau von überflüssigen DNA Fragmenten
- Denaturierung der RNA zur Auflösung von Sekundärstrukturen
- Anlagerung (*Annealing*) der Primer
- cDNA Synthese mittels Reverser Transkription

- RNase H Verdau von restlicher RNA

Als Primer wurden *Random Hexamer Primers* verwendet, die ein unspezifisches Umschreiben der Gesamt RNA erlauben. Die im Herstellermanual angegebenen Mengen und Konzentrationen wurden modifiziert, um bei möglichst geringem Materialeinsatz eine möglichst hohe cDNA Ausbeute zu erzielen. Genaue Mengenangaben und Arbeitsschritte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die RT-PCR wurde in einem PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, Waltham, USA) durchgeführt und die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der reversen Transkription wurde eine konventionelle PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt (3.7.2) und die Qualität der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophoretischer Auftrennung bestimmt (3.8).

Arbeitsschritt	Menge (Konz.)	Bezeichnung	Inkubation	Erläuterung
1) DNA Verdau	8µL (0,5µg/µL) 1µL 1µL	RNA 10xDNase Puffer DNase I	25°C, 15min 4°C, 1min	Verdau von DNA Fragmenten, welche die reverse Transkription stören könnten
2) Denaturierung	1µL (25mM)	EDTA	65°C, 15min 4°C, 1min	Inaktivierung der DNase I und Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen
3) <i>Annealing</i>	1,375µL  1,375µL (10mM)	Random Hexamer Primer dNTPs	65°C, 5min 4°C, 1min	Spezifische Bindung der Primer an die RNA
4a) reverse Transkription (Teil 1)	2,75µL 5,5µL (25mM) 2,75µL (0,1M) 1,375µL	10xRT-Puffer MgCl <sub>2</sub> DTT RNaseOUT™	25°C, 2min	Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen durch DTT, Inhibition von RNasen durch RNaseOUT™ und Lieferung der Kationen für die reverse Transkriptase durch MgCl <sub>2</sub>
4b) reverse Transkription (Teil 2)	1,375µL	Super-Script™ II	25°C, 10min 42°C, 50min 70°C, 15min 4°C, 1min	cDNA Synthese bei 42°C und anschließende Spaltung unspezifischer RNA/DNA Hybride bei 70°C
5) RNA Verdau	1,375µL	RNase-H	37°C, 20min 4°C, 1min	Abbau restlicher RNA Fragmente

**Tabelle 3.1      Protokoll der RT-PCR**

## 3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 3.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip

(Saiki et al., 1988)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Die Spezifität wird durch Oligonukleotid-Primerpaare erreicht. Als Matrize (*Template*) dienen genomische DNA, cDNA und Plasmid-DNA. Die Automatisierung der Amplifikation wird durch die Verwendung einer thermostabilen DNA-abhängigen Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) erreicht. Ein Zyklus einer PCR-Reaktion umfasst drei Schritte:

- Denaturierung: Trennung der Doppelstränge der *Template*-DNA
- *Annealing*: Bindung der Primer an komplementäre Sequenzen in der *Template*-DNA
- Elongation: Synthese eines neuen DNA-Doppelstrangs durch Verlängerung der Primer

Die Denaturierung findet meist bei 90-95°C statt. Die optimale *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer und muss empirisch bestimmt werden. Als Anhaltspunkt dient die Schmelztemperatur der Primer, die mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden kann:

$$T_m = 4x(\text{Anzahl G+C}) + 2x(\text{Anzahl A+T})$$

Da die Schmelztemperatur diejenige Temperatur angibt, bei der nur noch 50% der Primer an die *Template*-DNA gebunden sind, sollte die *Annealing*-Temperatur 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur gewählt werden. Listen mit allen verwendeten Oligonukleotid-Primern finden sich im Anhang. Alle Primersequenzen, mit Ausnahme der Mutationsprimersequenzen, wurden mithilfe des Primer3-Programms (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) generiert. Die Elongations-Temperatur ist abhängig vom verwendeten Enzym. So haben die meisten Taq-Polymerasen ihr Temperaturoptimum bei 72°C, während die Pfu-Polymerasen (aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*) am effektivsten bei 68°C synthetisieren. Die Polymerasen unterscheiden sich allerdings nicht nur in ihrem Temperaturoptimum sondern vor allem auch in ihrer Fehlerrate und ihrer Prozessivität. Die Auswahl der passenden Polymerase für verschiedene Fragestellungen hat große Bedeutung für das Gelingen eines Experiments. So weisen die Taq-Polymerasen mit 2-4kb/min zwar eine hohe Prozessivität auf, haben aber aufgrund fehlender 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine hohe Fehlerrate von etwa  $10^{-4}$ . Damit eignen sich die Taq-Polymerasen hervorragend für die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente oder *Screening*-

Prozesse, beispielsweise aber nicht für die Generierung von Klonierungs-*Inserts*, die möglichst keine Fehler in der Nukleotidabfolge aufweisen sollten. Die PCR kann für die verschiedensten Fragestellungen herangezogen werden. In dieser Arbeit wurde sie für qualitative und quantitative Nachweise von Nukleinsäuren, Klonierungsarbeiten, Identifizierung von positiven bakteriellen Klonen und zur Mutation spezifischer Sequenzabschnitte verwendet.

### 3.7.2 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde für Expressionsanalysen und zur Qualitätskontrolle von cDNA nach reverser Transkription durchgeführt. Es wurde das *HotStarTaq® DNA Polymerase Kit* (Quiagen, Hilden) verwendet und als PCR-Maschine diente der PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, Watham, USA). Als *Template* für die Expressionsanalysen diente Kolon-Normalgewebe cDNA. Tabellen 3.2 und 3.3 zeigen die Zusammensetzung eines 20µL PCR-Ansatzes und das verwendete Temperaturprofil. Das anfängliche Erhitzen auf 95°C für 15min dient der Aktivierung der Polymerase. Die optimale *Annealing*-Temperatur wurde für jedes Primerpaar empirisch bestimmt. Die Produkte wurden nach der PCR Agarose-Gelelektrophoretisch aufgetrennt und bezüglich ihrer Länge beurteilt (3.8).

Eingesetzte Menge	Bezeichnung
2µL	10x Puffer
4µL	5x Q-Solution
1µL	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
0,5µL	dNTP Mix (10mM)
1µL	Primer FW (10µM)
1µL	Primer RV (10µM)
0,2µL	HotStar Taq®
1µL	Template
9,3µL	H <sub>2</sub> O

Tabelle 3.2 20µL-Ansatz konventionelle PCR

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	95°C	15min	
Denaturierung	95°C	30sek	} 40 Zyklen
<i>Annealing</i>	58-60°C	1min	
Elongation	72°C	1min	
	72°C	5min	

Tabelle 3.3 Temperaturprofil konventionelle PCR

### 3.7.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

(Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993)

Während bei der konventionellen PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte lediglich eine qualitative bzw. semiquantitative Aussage über die amplifizierte DNA möglich ist, kann durch die qRT-PCR eine Aussage über die absolute Menge der DNA gemacht werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich qRT-PCRs mit *SYBR® Green* (Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt, sodass auch nur dieses Prinzip erklärt werden soll. *SYBR® Green* ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und nach Bindung durch Anregung 1000-fach stärker fluoresziert als im ungebundenen Zustand. Je mehr doppelsträngige DNA vorliegt, umso mehr Farbstoff wird gebunden und umso stärker ist die Fluoreszenz, die am Ende jedes Elongationsschrittes bei 480nm gemessen wird. So konnte ein Profil der Zunahme der DNA-Menge anhand des Fluoreszenzmusters erstellt werden. Da sich *SYBR® Green* unspezifisch auch an Primerdimere und unerwünschte PCR-Produkte anlagert, wurde am Ende eines PCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, um zwischen verschiedenen Produkten zu differenzieren. Hierfür wurden die Ansätze schrittweise auf 80°C erhitzt, wodurch es abhängig von der Länge der Produkte zur Denaturierung der Doppelstränge und einem Abfall der Fluoreszenz kam. Die erhobenen Ct-Werte wurden auf GAPDH normiert um Schwankungen in der Templatemenge auszugleichen. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Alle qRT-PCR Daten wurden auf einem Corbett Rotorgene RG-3000 (Quiagen, Hilden) und einem Realplex® Mastercycler epgradient S (Eppendorf, Hamburg) erhoben. Die Ansätze und Temperaturprofile waren für beide Geräte dieselben. (Siehe Tabellen 3.4 und 3.5)

Eingesetzte Menge	Bezeichnung
2µL	10x Puffer
4µL	5x Q-Solution
1µL	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
0,5µL	dNTP Mix (10mM)
1µL	Primer FW (10µM)
1µL	Primer RV (10µM)
0,8µL	SYBR® Green I
0,2µL	HotStar Taq®
1µL	Template
8,5µL	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3.4     20µL-Ansatz qRT-PCR**

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	95°C	15min	40 Zyklen
Denaturierung	95°C	30sek	
<i>Annealing</i>	58-60°C	1min	
Elongation	72°C	30sek	
Messpunkt	82°C	20sek	

Tabelle 3.5 Temperaturprofil qRT-PCR

### 3.7.4 Klonierungs-PCR

Die Methode der PCR wurde im Rahmen von Klonierungen verwendet, um erstens gewünschte Vektor-Einsätze (*Inserts*) zu amplifizieren und zweitens bakterielle Klone nach Transformation (3.9.4) auf Positivität zu prüfen (*Screening*). Für die Amplifikation von *Inserts* wurde die *Phusion® HotStart DNA Polymerase* (Finnzymes, Hess.Oldendorf) verwendet. Es handelt sich um eine *Pfu*-ähnliche *High-Fidelity*-Polymerase mit 3'-5'- und 5'-3'-Exonukleaseaktivität, deren Fehlerrate mit  $4,4 \times 10^{-7}$  sehr viel geringer ist, als die der *Taq*-Polymerasen. Als *Templates* wurden *Full-Length*-Klone und *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) (imaGenes, Berlin) der gewünschten Gene bzw Genabschnitte verwendet. Um Sekundärstrukturen vorzubeugen und die Reaktionsbedingungen zu optimieren, wurde die Q-Solution aus dem *HotStarTaq® DNA Polymerase Kit* (Quiagen, Hilden) zum Protokoll hinzugefügt. Auch hier wurden die optimalen *Annealing*-Temperaturen für jedes Primerpaar empirisch bestimmt. Eine Liste mit allen Klonierungsprimern findet sich im Anhang. Die Tabellen 3.6 und 3.7 zeigen die Zusammensetzung eines Amplifikationsansatzes für die Generierung von *Inserts* und das dazugehörige Temperaturprofil.

Eingesetzte Menge	Bezeichnung
10µL	5x HF Puffer
10µL	5x Q-Solution
1,5µL	dNTP Mix (10mM)
3µL	Primer FW (10µM)
3µL	Primer RV (10µM)
0,6µL	Phusion® HotStart
1,5µL	Template
20,4µL	H <sub>2</sub> O

Tabelle 3.6 50µL-Ansatz Klonierungs-PCR für *Inserts*

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	98°C	30sek	} 35 Zyklen
Denaturierung	98°C	15sek	
<i>Annealing</i>	50°C	15sek	
Elongation	72°C	30sek/kb	
	72°C	5min	

**Tabelle 3.7** Temperaturprofil Klonierungs-PCR für *Inserts*

Die Elongationszeit war abhängig von der Länge der zu amplifizierenden *Inserts* und wurde mit 30sek/kb berechnet. Die PCR wurde in einem PTC-200 Thermo Cycler (MJ Research, Watham, USA) durchgeführt. Für das *Screening* auf positive Klone nach erfolgter Transformation wurde die *Paq5000™ DNA Polymerase* (Agilent, München) verwendet. Die Paq5000 ist ein Enzym aus einem Bakterium der *Pyrococcus*-Spezies und zeichnet sich vor allem durch eine hohe Prozessivität aus. Sie wurde beim *Screening* der Taq-Polymerase vorgezogen, wegen geringerer Beschaffungskosten. Die *Screening*-PCRs wurden nach der *Quick-and-Dirty* Methode durchgeführt, wobei die bakteriellen Klone direkt, ohne weitere Aufreinigung, als *Template* eingesetzt wurden. Eine Liste der *Screening*-Primer findet sich im Anhang. Die Tabellen 3.8 und 3.9 zeigen einen *Screening*-Ansatz und das entsprechende Temperaturprofil. Die Elongationszeiten variierten mit der Länge der gewünschten Produkte und wurden mit 30sek/kb berechnet. Alle *Screening*-PCRs wurden in einem Corbett CG1-96 Palmcycler (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Die Amplifikationsansätze wurden Agarose-Gelelektrophoretisch analysiert (3.8).

Eingesetzte Menge	Bezeichnung
2µL	10x Paq Puffer
0,5µL	dNTP Mix (10mM)
1µL	Primer FW (10µM)
1µL	Primer RV (10µM)
0,5µL	Paq5000™
1µL	Template
14µL	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 3.8** 20µL-Ansatz *Screening*-PCR

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	95°C	3min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	20sek	
<i>Annealing</i>	50°C	20sek	
Elongation	72°C	30sek/kb	
	72°C	5min	

Tabelle 3.9 Temperaturprofil **Screening-PCR**

### 3.7.5 Mutations-PCR

Mutations-PCRs wurden durchgeführt um Bindungssequenzen in Promotorfragmenten spezifisch zu verändern. Es wurde hierfür das *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, München) verwendet. Die notwendigen Mutationsprimer wurden mithilfe des *Quick Change Primer Design* Programms gewählt. Eine Liste der verwendeten Mutationsprimer findet sich im Anhang. Die Mutationsprimer wurden so generiert, dass sie komplementär zu jeweils einem der Doppelstränge eines Plasmids sind und die veränderten Nukleotide enthalten. Als DNA-Polymerase wurde eine *Pfu*-Polymerase verwendet, die an den Primern ansetzt, diese verlängert und so Plasmide synthetisiert, die die gewünschte Mutation enthalten. Zusammensetzung eines Mutations-PCR-Ansatzes und dazugehöriges Temperaturprofil sind den Tabellen 3.10 und 3.11 zu entnehmen.

Eingesetzte Menge	Bezeichnung
5µL	10x Puffer
1µL	dNTP Mix (10mM)
1µL	Primer FW (125ng/µL)
1µL	Primer RV (125ng/µL)
1µL	Pfu Ultra
5µL	Template (10ng/µL)
36µL	H <sub>2</sub> O

Tabelle 3.10 50µL-Ansatz Mutations-PCR

Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Enzymaktivierung	95°C	30sek	} 18 Zyklen
Denaturierung	95°C	30sek	
<i>Annealing</i>	50°C	1min	
Elongation	68°C	6min	
	68°C	10min	

Tabelle 3.11 Temperaturprofil Mutations-PCR



Um die neu synthetisierten mutierten Plasmide von den *Template*-Plasmiden zu trennen, wurde an die PCR ein Dpn I Verdau angehängt. Die Restriktionssequenz für Dpn I lautet 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3', das heißt Dpn I schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Die eingesetzten *Template*-Plasmide stammten alle aus *dam*<sup>+</sup>-*E.coli* Stämmen und waren daher stark methyliert. Somit wurde während des Dpn I Verdaus zwar die methylierte *Template*-DNA abgebaut, nicht aber die neu synthetisierte unmethylierte DNA. Abschließend wurden die neu synthetisierten Plasmide in *XL1-Blue supercompetent E.coli* (Agilent, München) transformiert (3.9.4)

### 3.8 Agarose-Gelelektrophorese

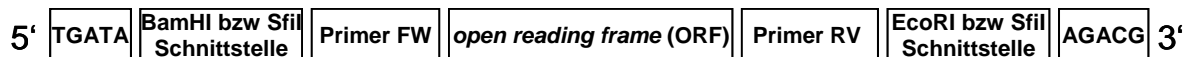
(Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Es wurden 1,5% Agarosegele verwendet. Dafür wurden 1,5g Agarose (Biozym, Hess.Oldendorf) in 100mL 1xTAE Puffer (2.2.2.4) aufgekocht, mit 3,5µL Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) versehen und zum Abkühlen in einen Gelschlitten (Biorad, München) gegossen. Je nach Taschenbedarf wurden 15er-, 20er- oder 30er-Kämme verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 6x *Orange Loading DNA* Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt, der aufgrund seines Glyceringehaltes für ein schnelles Absinken der Proben in den Taschen sorgt. Die abgekühlten Gele wurden in eine Gelkammer gelegt (Biorad, München), die Taschen wurden mit 10-20µL Probenvolumen beladen und die Elektrophorese wurde bei 120V für 20min durchgeführt. Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid in die DNA-Doppelstränge konnten die Fragmente abschließend in einem UV-Transluminator (UVP Ltd., Cambridge) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Als Größenstandard diente die *O'Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot). Wenn notwendig wurden die gewünschten DNA-Fragmente nach der Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des *NucleoSpin® Extract II* Gelextraktionskit (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 3.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 3.9.1 Vektoren und Einsätze (*Inserts*)

Klonierungen wurden verwendet, um konstitutiv aktive und induzierbare Expressionskonstrukte und Reportergenkonstrukte zu generieren. *Insert*-DNA wurde wie in 3.7.4 beschrieben mittels Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer synthetisiert. Das Prinzip des Designs der Klonierungsprimer wird in Abbildung 3.1 dargestellt.

**Expressionskonstrukte****Reportergenkonstrukte****Abbildung 3.1 Prinzipien des Primerdesigns für Klonierungsprimer**

Die Klonierungsprimer wurden so generiert, dass die zu klonierende Sequenz (ORF oder Promotorfragment) von spezifischen Primern flankiert wurden, an deren 5'- bzw 3'-Enden Schnittstellen für Restriktionsenzyme und ein kurzer Überhang angebaut waren, sodass die Restriktionsenzyme effektiver binden konnten.

Als Vektoren wurde für die konstitutiv aktiven Expressionskonstrukte der pcDNA3-Vektor (Invitrogen, Darmstadt), für die induzierbaren Expressionkonstrukte der pRTS1-Vektor (Bornkamm et al., 2005) und für die Reportergenkonstrukte der pGL3-Basic-Vektor (Promega, Mannheim) gewählt. Um die Klonierungsarbeiten zu erleichtern und zu beschleunigen, wurde auf bereits vorhandene Konstrukte zurückgegriffen und, soweit möglich, lediglich die *Inserts* ausgetauscht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Epitope Hämagglutinin (HA) und 3xFLAG, die in den Ursprungsvektoren hinter die *Coding Sequence* (CDS) kloniert worden waren, im Vektor verblieben, während die CDS ausgetauscht wurde. Einzige Ausnahme stellte die Klonierung des induzierbaren Expressionskonstruktes für ATOH8 dar (pRTS1-ATOH8-3xFLAG), hier wurden CDS und Epitop des Ursprungsconstructes ersetzt. Tabelle 3.12 zeigt alle neu klonierten Konstrukte und die Konstrukte, aus denen sie hervorgegangen sind. Als Template für die Amplifikation der Insert-DNA wurden im Fall der Expressionskonstrukte *Full-Length-Klone* (imaGenes, Berlin) der entsprechenden Gene verwendet und für die Reportergenkonstrukte *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC) (imaGenes, Berlin), die die benötigten Promotorbereiche enthielten (3.7.4).

Ursprungsconstruct	Quelle	neue Konstrukte
pcDNA3/HATH1-3xFLAG	AG Kolligs, <i>unpublished</i>	pcDNA3/ATOH8-3xFLAG pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG
pcDNA3/ATOH8-3xFLAG pRTS1/ITF2B-HA	(Herbst et al., 2009a)	pRTS1/ATOH8-3xFLAG
pGL3-Basic/Cip1 K	(Herbst et al., 2009a)	pGL3-Basic/ATOH8 2227nt pGL3-Basic/ATOH8 1483nt pGL3-Basic/ATOH8 1145nt pGL3-Basic/ATOH8 562nt

**Tabelle 3.12 Ursprungsconstructe und neu klonierte Konstrukte**

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Fragmente der gewünschten Länge aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des *NucleoSpin® Extract II* Gelextraktionskits (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt und bei 4°C gelagert (3.8).

### 3.9.2 Enzymatischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Aufgereinigte *Inserts* und dazugehörige Vektoren wurden mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, um „*sticky ends*“ zu generieren, die eine Ligation des *Inserts* in den Vektor ermöglichen. Hierfür wurde standardmäßig ein 60µl-Ansatz gewählt, mit 5-10µg *Insert*- bzw Plasmid-DNA und 20 Einheiten (*units*) Enzym. Die Verdau wurde 2h beim Temperaturoptimum des eingesetzten Enzyms im Wasserbad inkubiert. Doppelverdau wurden in kompatiblen Puffern des Herstellers durchgeführt. Nach Beenden des Verdau wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt, um kleine DNA-Fragmente (*Polylinker*), alte *Inserts* und Enzym zu entfernen, und erneut ausgeschnitten und aufgereinigt (3.8).

### 3.9.3 Ligation

Die Verbindung von Vektor und Insert erfolgt durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Diese Reaktion wird unter ATP-Verbrauch von dem Enzym T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) katalysiert. Es wurden 10µL-Ansätze gewählt und restriktionsenzymatisch linearisierter Vektor und geschnittenes Insert im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt gemeinsam mit vom Hersteller gelieferten 10 x Ligasepuffer und 0,1 x Volumen T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz wurde 30min bei RT inkubiert und die T4-DNA-Ligase anschließend hitzeinaktiviert (65°C, 10min).

### 3.9.4 Plasmidtransformation in kompetente *Escherichia coli*-Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

Für die Transformation wurden *DH5α-E.coli* Bakterien (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Einzige Ausnahme stellte die Transformation von Konstrukten dar, deren Sequenz mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, München) verändert worden war (3.7.5). Hier wurden für die Transformation *XL1-Blue supercompetent E.coli* verwendet. Das Protokoll der Transformation war für beide *E.coli* Stämme nahezu identisch. Es wurden 50µL der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, 1-10ng Plasmid bzw. maximal 5µL Ligationsansatz zugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Als Kontrollplasmid wurde pUC19 transformiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45sek, anschließend wurde wieder 2min

auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500µL SOC-Medium (2.2.2.5) wurden die Bakterien 1h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die *DH5α-E.coli* Bakterien wurden abzentrifugiert (1min, 3.000xg, RT), in 100µL SOC-Medium resuspendiert und auf Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, ausplattiert. Die *XL1-Blue supercompetent E.coli* wurden nicht abzentrifugiert, hier wurde das komplette SOC-Medium Volumen auf 2 Agarplatten verteilt (250µL pro Platte). Die Platten wurden für 14-16h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Gewachsene Klone wurden mittels PCR (3.7.4) gescreent. Einzelkolonien, die ein *Insert* richtiger Länge enthielten, wurden in 4mL LB-Medium (Invitrogen, Darmstadt) mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mithilfe des *HiYield® Plasmid Mini Kit* (SLG, Gauting) nach Herstellerangaben isoliert und mittels Sequenzierung (3.10) auf unerwünschte Mutationen überprüft.

### 3.10 DNA Sequenzierung nach Sanger

(Sanger et al., 1977)

Die Sequenz der klonierten Konstrukte wurde mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger überprüft. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg und von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Blum, Genzentrum, München durchgeführt. Das Prinzip des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger besteht in einem PCR-ähnlichen Ansatz, dem anstelle von desoxy-Nukleotiden (dNTPs) didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) beigesetzt werden. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert und führt bei seinem Einbau zum Abbruch der Kettenverlängerung, da sie keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Farbsignale (Chromatogramm) gibt die Sequenz der untersuchten DNA wieder. Eine Liste der verwendeten Sequenzierungsprimer findet sich im Anhang.

### 3.11 Reportergenassays (RGA)

Dieses Verfahren ermöglicht die Untersuchung von regulativen Prozessen der Genexpression und den Nachweis funktioneller Interaktionen zweier Transkriptionsfaktoren. Für die Reportergenassays wurden Promotorfragmente des *Atonal Homolog 8* Gens (ATOH8) in die *Multiple Cloning Site* (MCS) eines Luziferasevektors (pGL3-Basic, Promega, Mannheim) kloniert. Die Reportergenkonstrukte wurden nach Aufreinigung mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten der bHLH-Transkriptionsfaktoren ITF-2B und NeuroG3 (pcDNA3/ITF2B-HA und pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) transient kotransfiziert (3.17.3.2).

Wichtig für die Aussagekraft der Reporterassays ist die Tatsache, dass die Zellen, in welche transfiziert wird, keine oder nur eine sehr geringe endogene Produktion der zu untersuchenden Gene und Transkriptionsfaktoren besitzen. Die Expressionskonstrukte werden abgelesen und die synthetisierten Proteine binden im Optimalfall an das in den Luziferasevektor klonierte Promotorfragment, wodurch das hinter der MCS gelegene Luziferase-Gen abgelesen und Luziferase synthetisiert wird. Durch die Zunahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zu Kotransfektion mit dem Leervektor konnte so auf die Aktivierung des ATOH8-Promotors durch die kotransfizierten bHLH-Transkriptionsfaktoren geschlossen werden. Für die Reporterassays fanden die transienten Transfektionen im 24-well Format (BD Biosciences, Heidelberg) statt, wobei 24h vor Transfektion 70.000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Es wurden 200ng von jedem Konstrukt transfiziert. Zur Normierung wurde das konstitutiv aktive  $\beta$ -Galaktosidase-Reporterplasmid pCH110 (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet und als Positivkontrolle wurde ein Reporterassaykonstrukt mit artifiziellem Promotor eingesetzt, das eine große Anzahl an bHLH-Bindungsstellen besitzt und dessen Luziferaseaktivität effektiv durch ITF-2 aktiviert werden kann ( $\mu$ E5-TATA Reporterplasmid; Herbst & Kolligs, 2008). Zur Auswertung der Reporterassays wurden die Zellen 40-48h nach transienter Transfektion geerntet. Die Zellen wurden einmalig mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und es wurden 100 $\mu$ L 1xReporter-Lyse Puffer (Promega, Mannheim) in jedes Well pipettiert. Um die Zellen effektiv aufzuschließen, wurde ein Gefrier-Tau-Schritt eingeführt und die Zellen dann abgekratzt, in Eppendorfgefäße überführt und abzentrifugiert (5min, 14.000xg, 4°C). Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden 20 $\mu$ L Überstand mit 20 $\mu$ L Luziferin aus dem *Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) versetzt. Die synthetisierte Luziferase setzt unter ATP- und  $Mg^{2+}$ -Verbrauch Luziferin zu Licht um und die Lumineszenz konnte im Plattenluminometer ("Orion II Microplate Luminometer", Berthold Detection Systems GmbH, Heidelberg) gemessen werden. Für die Normierung wurden 40 $\mu$ L Überstand mit 40 $\mu$ L 2x- $\beta$ -Galaktosidase Puffer (2.2.2.6) für maximal 8h bei 37°C inkubiert. Die konstitutiv aktive  $\beta$ -Galaktosidase spaltet das im Puffer enthaltene Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid zu o-Nitrophenol, was zu einem Farbumschlag der Lösung führt, der photometrisch bei 405nm quantifiziert werden kann („Easy Reader SF Plus“, SLT Labinstrumente, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Die Intensität des Farbumschlages dient als Maß für die Transfektionseffizienz.

### 3.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen ihrer Größe nach und wird ermöglicht durch einen von Laemmli 1970 beschriebenen Puffer (2.2.2.7), der das anionische Detergens Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS, Sigma-Aldrich, München) enthält, das die Eigenladung der Proteine maskiert und zu einer negativen Nettoladung führt, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese nur noch durch die Größe der Proteine beeinflusst wird. Nach Proteinisolation (3.3) und Konzentrationsbestimmung (3.5) wurden 15µg Protein mit dem gleichen Volumen 2xLaemmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5min aufgeköcht, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Spalten von Wasserstoffbrücken aufzulösen. Zusätzliche Disulfidbrücken wurden durch das zugesetzte Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, München) gespalten. Die SDS-Page wurde diskontinuierlich mit einem pH- und Konzentrationssprung im Gel durchgeführt, um die Lauffronten zu bügeln und die Auflösung der Elektrophorese zu erhöhen. Das 10%ige Trenngel (2.2.2.7) wurde zwischen zwei Glasplatten (Biorad, München) mit Schichtdicke 1mm gegossen und bis zur Polymerisation mit 0,1% SDS bedeckt. Das polymerisierte Trenngel wurde dann mit 5%igem Sammelgel (2.2.2.7) überschichtet. Für die Elektrophorese wurden die Gele in eine Gelkammer (Biorad, München) gestellt und diese wurde mit Laufpuffer gefüllt (2.2.2.7). Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug 100V (Sammelgel) bzw. 200V (Trenngel) („PowerPac 300“, Biorad, München). Als Größenstandard wurden 5µL des Proteinstandards *Precision Plus* (Biorad, München) eingesetzt.

### 3.13 Western Blot

(Towbin et al., 1979; Gershoni & Palade, 1982)

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden wiederum elektrophoretisch nach dem *wet-blot* Verfahren auf eine Polyvinyliden Fluorid Membran (PVDF, Machery-Nagel, Düren) übertragen. Die Membran wurde 1min in Methanol (Carl Roth, Karlsruhe) aktiviert und anschließend in Transferpuffer (2.2.2.7) äquilibriert. Für die Elektrophorese wurde in einer Gelkammer (Biorad, München) mit Transferpuffer durch das Anlegen von 400mA für 1h ein elektrisches Feld erzeugt, das den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran zur Folge hatte. Der Erfolg des Transfers konnte durch den vorgefärbten Proteinstandard überprüft werden. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese direkt im Anschluss an den Transfer für 30min bei RT in Blockinglösung (2.2.2.7) auf einem Schüttler inkubiert.

### 3.14 Immunodetektion von Proteinen

Zum Nachweis der Proteine auf der PVDF-Membran wurde diese mit spezifischen Primärantikörpern entweder 40min bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Antikörper wurden zur Inkubation mit den Membranen in 1%-TBST-Michlösung (2.2.2.7) verdünnt (siehe Tabelle 3.13). Als Primärantikörper kamen ein Anti-Hämagglutinin (HA) Antikörper (Roche, Penzberg), ein Anti-FLAG Antikörper (Sigma-Aldrich, München) und ein Anti-Aktin Antikörper (MPBiomedicals, Eschwege) zum Einsatz, da alle Proteine mit Ausnahme von Aktin mit entweder HA oder FLAG markiert waren. Zur Detektion der Primärantikörper wurden die Membranen mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen und mit den entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 3.13) 40min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Detektion der Sekundärantikörper erfolgte nach einem weiteren Waschschrift mittels Chemilumineszenz. Die Entwicklungsreagenzien ECL1 und 2 (Super Signal® WestDura bzw. Super Signal® WestPico, ThermoScientific, Dreieich) wurden 1:1 gemischt und 1min mit der Membran geschwenkt. Hierbei wurde das in den Entwicklungslösungen enthaltene Luminol von der Peroxidase oxidiert. Die entstandene Lichtemission konnte auf einem Spezialfilm dokumentiert werden. Die Expositionsdauer betrug wenige Sekunden bis 5min, anschließend wurden die Filme entwickelt (Entwicklungsgerät „CURIX 60“, Agfa-Gevaert Gruppe, München).

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-HA High Affinity Antibody (Roche)	1:2.500
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 Antibody (Sigma)	1:1.000
Monoclonal Mouse Anti-Actin (MPBiomedicals)	1:2.500
Sekundärantikörper	
Mouse IgG, HRP-linked whole Antibody (GE Healthcare)	1:10.000
Goat-anti-rat-IgG-HRP (Santa Cruz)	1:10.000

**Tabelle 3.13 Antikörper zur Immunodetektion von Proteinen**

### 3.15 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Co-Immunopräzipitation diente dem Nachweis einer physikalischen Interaktion der bHLH-Transkriptionsfaktoren ITF-2B und NeuroG3 beziehungsweise ATOH8. Konstitutiv aktive Expressionskonstrukte für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA), NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) wurden jeweils einzeln und in Kombination miteinander und mit pcDNA3/leer transient in HEK293-Zellen transfiziert (3.17.3.2). Hierfür wurden die HEK293-Zellen 24h vor Transfektion in 6cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät und es wurden äquimolare Mengen der Konstrukte zur Transfektion

eingesetzt und die Plasmid-Gesamtmenge mit pcDNA3/leer auf 1 µg pro 6cm Zellkulturschale aufgefüllt. Als Kontrolle wurde eine Zellkulturschale mit 1 µg pBMN-Z-IRES-GFP transfiziert und die Anzahl der leuchtenden Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz vor der Ernte unter einem Fluoreszenzmikroskop („Axiovert 135 TV“, Carl Zeiss, Göttingen) beurteilt. 40-48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden sie einmalig mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen, in 300 µL ColP-Lysepuffer (2.2.2.8) mit 1:100 Proteaseinhibitor complete (Calbiochem, Darmstadt) abgekratzt und aufgenommen und 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µL PBS zugegeben und die Proben dreimal für je 10sek bei 10% Intensität mit Ultraschallstoßwellen (Sonopuls „HD2070“, Bandelin Electronic, Berlin) behandelt. Die verbleibenden Nukleinsäuren in den Lysaten wurden durch Zugabe von 0,5 µL Benzonase (Novagen, Darmstadt) und 10minütiger Inkubation auf Eis verdaut. Anschließend wurden die Proben vorgereinigt durch Zugabe von 20 µL A/G Agarose Beads (Santa Cruz, Heidelberg), Schüttelinkubation für 30min bei 4°C und Zentrifugation (1min, 14.000xg, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und mit den für die Immunopräzipitation geeigneten Antikörpern (Anti-HA bzw- Anti-FLAG) versetzt (Verdünnungen siehe Tabelle 3.14) und 4h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden 50 µL A/G Agarose Beads hinzugegeben um die Komplexe aus Antikörper und Protein zu präzipitieren. Nach Schüttelinkubation von 1h bei 4°C wurden die A/G Agarose Beads abzentrifugiert (1min, 14.000xg, 4°C), dreimal mit 1xReporter-Lysepuffer gewaschen und abschließend in 40 µL 2xLämmli-Puffer + 20% DTT aufgenommen und bei 95°C 5min aufgeköcht. Die Proteine wurden dann über eine SDS-PAGE (3.12) aufgetrennt, mittels Western Blot (3.13) auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch detektiert (3.14). Eine physikalische Interaktion wurde angenommen, wenn sich mit einem der Antikörper (Anti-HA oder Anti-FLAG) beide zu untersuchenden Proteine detektieren ließen.

### 3.16 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Diese Methode wurde angewandt, um eine physikalische Interaktion des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2B mit dem ATOH8 Promotor nachzuweisen. Es wurden DLD1 Zellen, die stabil mit einem Doxycyclin-induzierbaren Expressionskonstrukt für ITF-2B (Herbst et al., 2009a) transfiziert worden waren (3.17.3.3) in 10cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät, nach 24h mit 1:1000 Doxycyclin (Sigma-Aldrich, München) stimuliert und 40-48h nach Stimulation geerntet. Hierfür wurden zu anfangs an die DNA gebundene Proteine durch Zugabe von 1mL 10% Formaldehyd und 1,5mL 2,5M Glycin (Carl Roth, Karlsruhe) fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen, in 5mL PBS abgekratzt und abzentrifugiert (10min, 3.800xg, 4°C). Die Pellets wurden in 0,5mL ChIP-FA-Puffer (2.2.2.8) resuspendiert, die Proben 10min auf



Eis inkubiert und anschließend jeweils viermal für 10sek bei 10%iger Intensität mit Ultraschallstoßwellen (Sonopuls „HD2070“, Bandelin Electronic, Berlin) behandelt, um die DNA zu scheren und zu fragmentieren. Zellreste wurden abzentrifugiert (2min, 13000g, 4°C) und der Überstand zur Immunopräzipitation eingesetzt. Hierfür wurde 1mL Lysat mit 9mL ChIP-Dilution-Puffer (2.2.2.8) verdünnt und mit 50µL A/G Agarose Beads (Santa Cruz, Heidelberg), die mit Lachssperma DNA (Stratagene, Waldbronn) abgesättigt waren, durch 30minütige Schüttelinkubation bei 4°C vorgereinigt. Die A/G Agarose Beads wurden durch Zentrifugation (1min, 14.000xg, 4°C) entfernt und zum Überstand wurden den nötigen Verdünnungen entsprechende Mengen an Antikörper (siehe Tabelle 3.14) zugesetzt und die Proben bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

Antikörper	Verdünnung
HA tag antibody-ChIP Grade	1:3.000
Anti-Acetyl-Histon H3	1:2.000
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 Antibody	1:3.000
Anti-Gal4 Antikörper	1:2.000

**Tabelle 3.14 Für Immunopräzipitationen verwendete Antikörper**

Um die Komplexe aus DNA, Protein und Antikörper zu präzipitieren, wurden anschließend erneut 50µL abgesättigte A/G Agarose Beads hinzugegeben und wiederum 1h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die A/G Agarose Beads wurden abzentrifugiert (1min, 14.000xg, 4°C), dreimal mit 1mL ChIP-Wash-Puffer (2.2.2.8) und einmal mit 1mL ChIP-Final-Wash-Puffer (2.2.2.8) gewaschen. Die DNA-Protein-Antikörper Komplexe wurden von den Beads eluiert durch Zugabe von 120µL ChIP-Elutions-Puffer (2.2.2.8) und Inkubation bei RT für 15min. Die Agarose Beads wurden durch Zentrifugation entfernt und dem Überstand wurden 10µL Proteinase K (Roche, Penzberg) zur Auflösung der DNA-Protein-Antikörper Komplexe zugegeben und 5h bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde abschließend durch Phenol-Chloroform Extraktion (3.1) und Ethanol-fällung (3.2) aufgereinigt und konzentriert und als *Template* in einer konventionellen PCR (3.7.2) eingesetzt. Die Primer für die PCR wurden so generiert, dass sie an einen Bereich im ATOH8 Promotor binden, der anhand der Reporter-genassay-Ergebnisse für die Induktion der Expression von ATOH8 durch ITF-2 verantwortlich gemacht wurde. Ein zweites Primerpaar wurde als Negativkontrolle generiert und bindet hinter Exon 2 im ATOH8 Gen. Abbildung 3.2 zeigt die Lokalisation der Primerpaare auf dem ATOH8 Gen. Sequenzen der Primer finden sich im Anhang.



### Abbildung 3.2 Verteilung der ChIP Primer auf dem ATOH8 Gen

Für die ChIP-PCR wurde ein Primerpaar gewählt (ATOH8 ChIP A), das in dem Bereich des ATOH8-Promotors bindet, der nach Reporteragenassay-Ergebnissen die Bindungssequenz für ITF-2B enthält. Ein zweites Primerpaar (ATOH8 ChIP Ktr.) wurde so gewählt, dass es hinter Exon 2 bindet und so als Negativkontrolle herangezogen werden kann.

## 3.17 Zellkultur

### 3.17.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank („HERAsafe“, Thermo Fisher Scientific, Bonn) durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank („HERAcell 240“, Thermo Fisher Scientific, Bonn) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und in einem 5%igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch kultiviert. Sämtliche Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, stammten von der Firma PAA Laboratories aus Pasching, Österreich. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien (CaCo II, Colo205, Colo320, DLD1, HCT116, HT29, Isrecco, LoVo, LS174T, RKO, SW48, SW480, SW620, Widr) und HEK293 Zellen kultiviert und für Experimente herangezogen. Alle Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) in 10mL DMEM-Vollmedium, das 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) enthält, kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf ihr Wachstumsverhalten und eventuelle mikrobielle Verunreinigungen hin untersucht. Kontaminationen mit Mykoplasmen wurden regelmäßig ausgeschlossen. Die Zellen wurden zweimal pro Woche bei einer Konfluenz von etwa 90% passagiert. Hierzu wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, mit 1,5mL Trypsin bedeckt und wenige Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin-Zellgemisch wurde in DMEM-Vollmedium aufgenommen und abzentrifugiert (5min, 1.200xg, RT). Das Zellpellet wurde in DMEM-Vollmedium resuspendiert und die Zellen entweder zur Kultur oder nach genauem Auszählen in der Neubauer-Zählkammer (GFL, Burgwedel) für Experimente in gewünschter Dichte neu ausgesät.

### 3.17.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden kurz- und mittelfristig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank und langfristig bei  $-196^{\circ}\text{C}$  im Stickstofftank gelagert. Zum Einfrieren wurde Einfriermedium aus FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, München) verwendet. Das DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und schützt so die Zellmembran vor Schädigung. Aufgrund der Toxizität des DMSO erfolgten Einfrieren und Auftauen so zügig wie möglich. Zum Einfrieren wurden Zellen in 10cm Zellkulturschalen kultiviert und bei etwa 80%iger Konfluenz wie oben beschrieben geerntet und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1mL Einfriermedium resuspendiert, die Zellsuspension in ein Einfrierröhrchen überführt und umgehend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen mit der Zellsuspension für wenige Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  ins Wasserbad gestellt und anschließend in 10mL DMEM-Vollmedium aufgenommen und in einer 10cm Zellkulturschale ausgesät. Vor Verwendung für Experimente wurden die Zellen mindestens zweimal passagiert.

### 3.17.3 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Diese Fremd-DNA besteht meist aus Plasmiden, das heißt zirkulärer DNA, die als Vektoren für Gene oder Genabschnitte dienen. Man unterscheidet zwischen dem zeitweiligen Einbringen von Plasmiden in eine Zelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Wirtsgenom (stabile Transfektion). Normalerweise wird Fremd-DNA in den Zellen innerhalb weniger Tage abgebaut, bei Integration in das Genom besteht ein Schutz vor diesem Abbau. Die Techniken des Einbringens der DNA in die Zellen unterscheiden sich bei transienter und stabiler Transfektion nicht, wohl aber die verwendeten Vektoren und das weitere Verfahren mit den Zellen nach erfolgter Transfektion.

#### 3.17.3.1 Transfektionstechniken

Die Zellen wurden abhängig von der Zelllinie entweder mit Polyethylenimin (PEI, Polysciences, Eppelheim) oder mit *Lipofectamine 2000* (Lipo, Invitrogen, Darmstadt) transfiziert (siehe Tabelle 3.15).

Zelllinie	Transfektionsreagenz	Konzentration ( $\mu\text{L}$ Reagenz : $\mu\text{g}$ DNA)
HEK293	PEI	5:1
LS174T		5:1
RKO		5:1
SW480		5:1
HCT116		3:1
DLD1	Lipo	2:1
LoVo		2:1

**Tabelle 3.15 Transfektionsbedingungen einzelner Zelllinien**

PEI bildet mit der DNA positiv geladene Komplexe, die sich an der negativ geladenen Zellmembran anlagern und mittels Endozytose aufgenommen werden. Der große Vorteil des PEI liegt in seiner geringen Toxizität. Es wurde abhängig von der zu transfizierenden Zelllinie in Konzentrationen von 3  $\mu\text{L}$  bzw. 5  $\mu\text{L}$  pro 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt. Bei Lipo handelt es sich um ein Reagenz aus kationischen Liposomen, die die Plasmid-DNA aufnehmen und mit den Zellmembranen der zu transfizierenden Zellen fusionieren. Aufgrund seiner Toxizität wurde Lipo nur für die recht schwierige Transfektion von DLD1 Zellen eingesetzt, in Konzentrationen von 2  $\mu\text{L}$  pro 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA. Die Aussaat der Zellen für die Transfektion war abhängig von der Art des Experimentes und wird bei den jeweiligen Experimenten beschrieben. Die Aussaat erfolgte immer 24h vor der Transfektion, die Ernte bzw. das Umsetzen der Zellen 40-48h nach Transfektion. Die Transfektionseffizienz wurde durch die Transfektion eines GFP-Vektors (pBMN-Z-IRES-GFP) und Beurteilung der Zahl leuchtender Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop („Axiovert 135 TV“, Carl Zeiss, Göttingen) abgeschätzt.

#### Transfektionsprotokoll für PEI:

- Plasmid-DNA für 1 Well in 1,5mL Eppendorfgefäße pipettieren.
- Pro Eppendorfgefäß 50mL Opti-MEM® (Invitrogen, Darmstadt) + 3 bzw. 5  $\mu\text{L}$  PEI pro 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mischen und zur Plasmid-DNA geben.
- Inkubation 5min, RT
- Weitere 50mL Opti-MEM® in jedes Eppendorfgefäß pipettieren.
- Inkubation 15min, RT
- Transfektionsgemisch vorsichtig auf die Zellen tropfen.
- Zellen für 40-48h im Brutschrank inkubieren.

#### Transfektionsprotokoll für Lipo:

- Plasmid-DNA für 1 Well in 1,5mL Eppendorfgefäße pipettieren.
- Pro Eppendorfgefäß 50mL Opti-MEM® (Invitrogen, Darmstadt) + 2  $\mu\text{L}$  Lipo pro 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in neuem Eppendorfgefäß mischen.

- 50mL Opti-MEM® in jedes Eppendorfgefäß mit Plasmid-DNA geben .
- Inkubation 5min, RT
- 50mL Opti-MEM®/Lipo-Gemisch in Opti-MEM®/Plasmid-DNA-Gemisch pipettieren.
- Inkubation 20min, RT
- Transfektionsgemisch vorsichtig auf die Zellen tropfen.
- Nach 8-12h Medium wechseln.
- Zellen für 40-48h im Brutschrank inkubieren.

### 3.17.3.2 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen wurden für Reporterassays (3.11), Co-Immunopräzipitationen (3.15) und Koloniebildungsassays (3.18) durchgeführt. Für die Reporterassays und die Co-Immunopräzipitation fanden Kotransfektionen verschiedener Konstrukte statt. Die transient transfizierten Zellen wurden nach 40-48h geerntet mit Ausnahme der Zellen für die Koloniebildungsassays.

### 3.17.3.3 Stabile Transfektion

Zur Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden Doxycyclin-induzierbare Expressionskonstrukte für ATOH8 verwendet. Als Vektor diente der pRTS1-Vektor (Bornkamm et al., 2005), der einen Tetracyclin-kontrollierten-Transkriptionsaktivator (rtTA2s-M2) und –repressor (rTS-KRAB) unter der Kontrolle eines Hühner- $\beta$ -Aktin-Promotors enthält. Die in diesen Vektor klonierte CDS für ATOH8 wird von einem auf rtTA2s-M2 und rTS-KRAB reagierenden Promotor kontrolliert. Das heißt, das ATOH8-Gen wird in Anwesenheit von Tetracyclin bzw. Doxycyclin abgelesen, bei deren Abwesenheit jedoch wird die Expression von ATOH8 unterdrückt. Desweiteren enthält der pRTS1-Vektor ein Hygromycin-Resistenzgen, das die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen ermöglicht. Das ATOH8-Gen wurde 3xFLAG markiert (*getagged*), um eine Detektion im Western Blot zu erleichtern. DLD1 Zellen wurden in 6-Well-Platten (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät (250.000 Zellen pro Well), nach 24h wie oben beschrieben transfiziert und nach weiteren 40-48h geerntet (3.17.1). Die Zellpellets wurden nach Zentrifugation in 900 $\mu$ L DMEM-Vollmedium resuspendiert und es wurden je 50 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L und 400 $\mu$ L der Zellsuspension auf 10cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) in 10mL DMEM-Vollmedium ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit 0,9mg/mL Hygromycin B in Selektion genommen. Die notwendigen Hygromycin-B Konzentrationen für die Selektion waren vor Beginn der stabilen Transfektion durch eine Resistenzreihe ermittelt worden, wobei diejenige Konzentration verwendet wurde, bei der gerade alle Zellen starben. Das Selektionsmedium wurde einmal die Woche gewechselt, bis die Kolonien einen Durchmesser von 3-5mm hatten. Das

Isolieren der Einzelkolonien erfolgte nach Waschen der Platte mit PBS durch kurzes Andauen der Kolonien mit Trypsin und Überführen der Zellen in 96-Well-Platten. Jedes Well enthielt 100µL DMEM-Vollmedium und zusätzlich 10µL FCS zur Inaktivierung des Trypsins. Die Zellen wurden jeweils bei 90%iger Konfluenz in 48-, 24-, 12- und 6-Well Platten (BD Biosciences, Heidelberg) umgesetzt, immer unter Beibehaltung des Selektionsdruckes. Bei Erreichen des 6-Well Formates wurden die Zellen mit 1:1000 Doxycyclin (Sigma-Aldrich, München) stimuliert und es wurde die Expression von ATOH8 im Western Blot überprüft. Positive Klone wurden expandiert und bei -80°C eingefroren, negative Klone wurden verworfen.

### 3.18 Koloniebildungsassay (KBA)

Mit Hilfe eines Koloniebildungsassays wurde der Einfluss von ATOH8 auf das Wachstumsverhalten von Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden drei Kolonkarzinom-Zelllinien (DLD1, HCT116, SW480) transient mit entweder einem konstitutiv aktiven Expressionskonstrukt für ATOH8 (pcDNA3/ATOH-3xFLAG) oder dem entsprechenden Leervektor (pcDNA3, Invitrogen, Darmstadt) transfiziert (3.17.3.2). Für die Transfektion wurden von jeder Zelllinie 250.000 Zellen pro Well in einer 6-Well Platte (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit 1µg Konstrukt pro Well transfiziert und anschließend 40-48h im Brutschrank inkubiert. Zum Umsetzen der Zellen wurden diese geerntet (3.17.1) und vor dem Abzentrifugieren in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden dann zentrifugiert (5min, 1.200xg, RT) und das Pellet in einer entsprechenden Menge DMEM-Vollmedium aufgenommen, sodass die entstehende Zellsuspension eine Konzentration von 500.000 Zellen pro mL hatte. Von dieser Suspension wurde dann jeweils 1mL in 9mL DMEM-Vollmedium auf 10cm Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg) ausgesät, wobei pro Zelllinie und Konstrukt Triplikate ausgesät wurden. 24h nachdem die Zellen umgesetzt worden waren, wurden sie mit G418-Sulfat in Selektion genommen. Die notwendigen G418-Sulfat Konzentrationen für die Selektion waren vor Beginn des KBA durch eine Resistenzreihe ermittelt worden, wobei diejenige Konzentration verwendet wurde, bei der gerade alle Zellen starben. Die G418-Sulfat Konzentrationen für die einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

Zelllinie	Selektionsreagenz	Konzentration
DLD1	G418-Sulfat	1,2 mg/mL
HCT116		0,7 mg/mL
SW480		1,8 mg/mL

**Tabelle 3.16 G418-Sulfat Konzentrationen**

Das Selektionsmedium wurde einmal die Woche gewechselt, bis die Kolonien eine Größe hatten, die makroskopisch gut erkennbar war. Zur Färbung wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, es wurden 4mL Methylenblau (Carl Roth, Karlsruhe) in jede 10cm Zellkulturschale (BD Biosciences, Heidelberg) pipettiert und die Platten für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten sechsmal mit PBS und einmal mit H<sub>2</sub>O bidest gewaschen, getrocknet und bei 4°C aufbewahrt. Zum Auszählen der Kolonien wurden die Platten fotografiert.

## 3.19 Durchflusszytometrie

### 3.19.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie erlaubt die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen. Dafür werden suspendierte Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl (488nm Argonlaser) vorbeigeführt. Das entstehende Streulicht ist abhängig von Größe, Refraktionsindex, Membranstruktur und intrazellulären Bestandteilen der Zelle und wird in Quantität und Qualität vom Durchflusszytometer erfasst. Die Streulichtemission teilt sich auf in das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* FSC), das vor allem eine Aussage über die Querschnittsfläche und damit die Zellgröße macht, und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter* SSC), das eine Aussage über den Refraktionsindex und damit Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle macht. Werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, entweder in Form von Nukleinsäuren-bindenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder Propidiumjodid oder in Form von Farbstoffen, die an Antikörper gekoppelt sind, welche spezifisch Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Strukturen erkennen, können die spezifischen Emissionsspektren dieser Fluoreszenzfarbstoffe in drei unterschiedlichen Kanälen erfasst werden (FL1=537nm, FL2=597nm, FL3=650nm). Damit sind weitere Aussagen über zum Beispiel DNA Gehalt der Zelle oder Menge und Verteilung an spezifischen Oberflächenmolekülen möglich.

### 3.19.2 Zellzyklusanalyse nach Nicoletti

(Nicoletti et al., 1991)

Der Zellzyklus lässt sich in zwei Hauptphasen aufteilen: die Inter- und die Teilungsphase. In der Interphase findet die DNA-Replikation statt, welche wiederum in verschiedene Phasen unterteilt werden kann, die sich vor allem durch ihren DNA-Gehalt unterscheiden. In der Ruhephase G<sub>0</sub> und in der präsynthetischen Phase G<sub>1</sub> hat die Zelle einen diploiden Chromosomensatz. In der auf G<sub>1</sub> folgenden S-(Synthese)-Phase kommt es zur Verdopplung des DNA-Gehaltes der Zelle. Es folgt die postsynthetische G<sub>2</sub>-Phase, in welcher die Zelle

einen vollständig reduplizierten Chromosomensatz besitzt. Die nun folgende M-(Mitose)-Phase wird der Teilungsphase zugerechnet und zeichnet sich durch eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die bei der Teilung entstehenden Tochterzellen aus. Der subG1-Phase werden Zellen zugerechnet, die aufgrund apoptotischer DNA-Fragmentation einen kleineren DNA-Gehalt als den normalen diploiden Chromosomensatz besitzen. Mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen, die spezifisch an Nukleinsäuren binden, kann der DNA-Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch untersucht und die Zelle einer der Phasen des Zellzyklus zugeordnet werden. Problematisch ist, dass die Farbstoffe nicht zellmembrangängig sind und außerdem nicht nur in DNA, sondern auch in doppelsträngige RNA interkalieren. Durch die Verwendung des hypotonen Puffers nach Nicoletti (2.2.2.9), der das Detergenz Triton X-100 enthält, wird spezifisch die zytoplasmatische Membran der Zellen lysiert. Die vor allem im Zytoplasma befindliche RNA geht verloren, der Kern bleibt jedoch intakt und die dort enthaltene DNA kann durch das ebenfalls im Puffer enthaltene Propidiumjodid angefärbt werden.

### **3.19.3 Vorbereiten und Anfärben der Proben**

Für die Zellzyklusanalysen wurden stabil transfizierte Doxycyclin-induzierbare ATOH8-Klone verwendet. Es wurden 90.000 Zellen pro Well im 12-Well Format in DMEM-Vollmedium ausgesät und 12h nach Aussaat mit 1:1000 Doxycyclin (Sigma-Aldrich, München) stimuliert. Nach 24h wurde das Vollmedium mit serumfreiem Medium ersetzt und die Zellen 48h in Hungermedium gehalten, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Anschließend wurde der Zellzyklus durch Vollmedium wieder angetrieben und die Zellen nach 16h geerntet. Dafür wurden die Zellen im Medium abgekratzt, pelletiert (5min, 3.500xg, 4°C) und das Pellet mit PBS gewaschen und in 200µL Nicoletti-Puffer (2.2.2.9) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend mindestens 30min bei 4°C und unter Lichausschluss inkubiert und vor Messung im Durchflusszytometer nochmals so mit PBS verdünnt, dass nicht mehr als 800 Zellen pro Sekunde den Argonlaser passierten. Als Durchflusszytometer wurde das FACSCalibur von BD Biosciences, Franklin Lakes, USA verwendet, zur Datenauswertung diente die Cell Quest® Software derselben Firma.

### **3.20 DNA-Mikroarray**

Anhand eines DNA-Mikroarrays kann das Genexpressionsmuster in Zellen untersucht werden. Als Mikroarray wird ein Träger bezeichnet, auf dem in definierten Positionen cDNA oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide angebracht sind, die bei Hybridisierung mit dem fluoreszenzmarkierten Probenmaterial (cDNA) als Sonden fungieren. Das verwendete



---

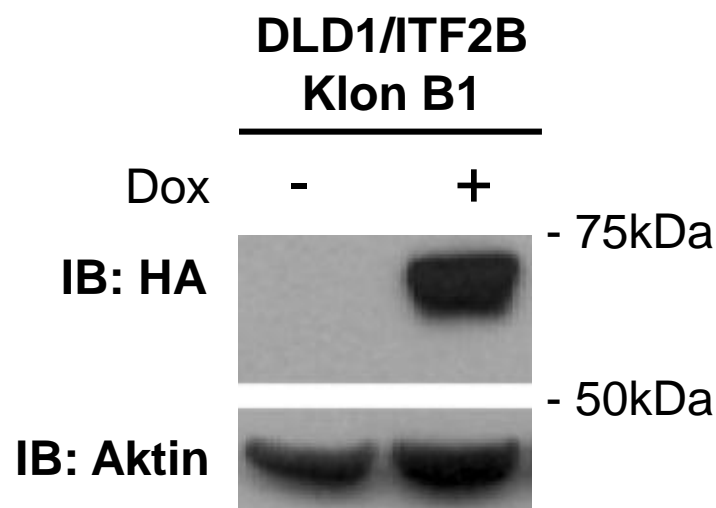
*Human Genome U133 Set* (Affymetrix, München) besteht aus zwei DNA-Mikroarrays und enthält insgesamt Bindungssequenzen für etwa 33.000 Gene des menschlichen Genoms. Für diese Arbeit wurde der DNA-Mikroarray eingesetzt um Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2 zu identifizieren. Die Versuche wurden größtenteils von der Arbeitsgruppe Blum am Genzentrum München durchgeführt. Es wurden stabil transfizierte DLD1 Zellen, die ein Doxycyclin-induzierbares Expressionskonstrukt für ITF-2 enthielten in Kultur genommen und nach 24h mit Doxycyclin stimuliert, um die Expression von ITF-2 anzuregen. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, es wurde RNA extrahiert (3.1), in cDNA umgeschrieben (3.6) und die cDNA wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zur Hybridisierung im Mikroarray eingesetzt. Anschließend wurde der Array mit einem Laser bei 540 nm und 630 nm ausgelesen. Anhand der Farben und der Positionen der Gene auf dem Chip konnte abgelesen werden ob ein Gen durch die Anwesenheit von ITF-2 vermehrt, vermindert oder unverändert exprimiert wird.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2B

#### 4.1.1 Identifikation von Zielgenen

Als *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktor bindet ITF-2B an E-Boxen im Promotor- oder Enhancerbereich seiner Zielgene und induziert so deren Expression. Um festzustellen, welche Gene durch ITF-2B reguliert werden, wurde ein DNA-Mikroarray durchgeführt. Hierfür wurde aus DLD1-Zellen, die mit einem Doxycyclin-abhängigen Expressionskonstrukt für ITF-2B stabil transfiziert worden waren (DLD1/ITF-2B-HA Klon B1 Abb. 4.1; Herbst et al., 2009a), nach Stimulation mit Doxycyclin Gesamt-RNA gewonnen, diese in cDNA umgeschrieben und zur Hybridisierung im DNA-Mikroarray eingesetzt.



**Abbildung 4.1 ITF-2B Expression in DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) nach Doxycyclin-Stimulation**

DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert bzw. nicht stimuliert und die Expression des ITF-2B Proteins im Western Blot untersucht. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert

Die verwendeten DNA-Mikroarray-Chips (*Human Genome U133 Set*, Affymetrix, München) enthielten Bindungssequenzen für circa 33.000 Gene. Als relevant betrachtet wurden nur die 42 Gene, für die im Mikroarray mindestens eine zweifache Induktion der Expression durch ITF-2B gezeigt werden konnte. Tabelle 4.1 zeigt eine Auflistung all dieser Gene mit Angaben zur Höhe der Induktion durch ITF-2B, biologischen Prozessen und molekularen Funktionen, an denen die Genprodukte beteiligt sind, und Vorkommen der Proteine.

Induction	Gene Symbol	Gene Title	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
29,45	ITF-2	Immunoglobuline transcription factor 2	-regulation of transcription	-transcription factor activity -protein heterodimerization activity	-nucleus -transcription factor complex
4,92	ATP6V1C2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	-ATP synthesis coupled proton transport	-catalyzing transmembrane movement of substances	-proton-transporting two-sector ATPase complex
4,63	MUC20	mucin 20	-protein homooligomerization	-glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	-basal plasma membrane -integral to membrane
4,32	AQP3	aquaporin 3	-transport -excretion	-transporter activity	-integral to plasma membrane
4,29	S100P	S100 calcium binding protein P	-endothelial cell migration	-magnesium ion binding -calcium-dependent protein binding	-nucleus -cytoplasm
4,29	PRSS2	protease, serine, 2	-proteolysis -digestion -positive regulation of cell growth and adhesion -collagen catabolic process	-serine-type endopeptidase activity	-extracellular matrix
3,92	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	-lipid metabolic process -lipid-transport -endocytosis -signal transduction -nervous system development -cholesterol metabolic process	-low-density lipoprotein receptor activity	-integral to membrane
3,76	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	---	---	---

3,43	ASNS	asparagine synthetase	-asparagine biosynthetic process -glutamine metabolic process	-asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) activity -ligase activity	-soluble fraction
3,43	STAP1	signal transducing adaptor family member 1	-intracellular protein transport -membrane fusion -humoral immune response -transmembrane receptor -protein tyrosine kinase signaling pathway -intracellular signalling cascade	-SH3/SH2 adaptor activity	-cytoplasm
3,32	PCK2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	-gluconeogenesis	-phosphoenolpyruvate -carboxykinase activity -GTP binding -lyase activity	-mitochondrion
3,25	KISS1R	KISS1 receptor	-G-protein coupled receptor protein signaling pathway -behavior -negative regulation of cell proliferation -negative regulation of cell migration	-G-protein coupled receptor activity	-integral to membrane
3,16	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	-regulation of cell cycle -regulation of cyclin dependent protein kinase activity -response to DNA damage -cell cycle arrest -regulation of cell proliferation -induction of apoptosis -positive regulation of non apoptotic programmed cell death	-cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity	-cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex -nucleus -cytoplasm

2,87	NUPR1	nuclear protein 1	-induction of apoptosis -cell growth	---	-nucleus
2,85	MKX	mohawk homeobox	-regulation of transcription -multicellular organismal development -muscle development	-transcription factor activity	-nucleus
2,83	PTPRE	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	-protein amino acid dephosphorylation	-transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity -hydrolase activity	-soluble fraction -cytoplasm -integral to membrane
2,79	ATOH8	atonal homolog 8 (Drosophila)	-regulation of transcription	-transcription regulator activity	-nucleus
2,79	ZNF238	zinc finger protein 238	-regulation of transcription -chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota)	-transcription factor activity -specific RNA polymerase II transcription factor activity	-nucleus
2,73	RASSF6	Ras association domain family 6	-signal transduction	-protein binding	---
2,66	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	-transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway -visual perception -induction of apoptosis by extracellular signals	-metalloendopeptidase inhibitor activity	-proteinaceous extracellular matrix -basement membrane
2,60	CHAC1	cation transport regulator homolog 1	---	-protein binding	---
2,57	SLC16A4	solute carrier family 16, member 4	-monocarboxylic acid transport	-monocarboxylic acid transmembrane transporter activity	-integral to membrane

2,57	JDP2	jun dimerization protein 2	-regulation of transcription	-transcription factor activity -protein dimerization activity	-nucleus
2,53	ATP2C2	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, type 2C, member 2	-cation transport -metabolic process -proton transport	-hydrolase activity, -catalyzing transmembrane movement of substances	-integral to membrane
2,46	SESN2	sestrin 2	cell cycle arrest	---	-nucleus -cytoplasm
2,46	TUBE1	tubulin, epsilon 1	-microtubule-based movement -centrosome cycle -protein polymerization	-nucleotide binding -GTPase activity -structural constituent of cytoskeleton	-pericentriolar material -microtubule
2,45	CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta	-protein amino acid phosphorylation -signal transduction	-protein serine/threonine kinase activity -calmodulin binding -ATP-binding -transferase activity	---
2,36	ATP8B2	ATPase, Class I, type 8B, member 2	phospholipid transport	-ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions -phosphorylative mechanism	-integral to membrane
2,35	PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)	-proteolysis -digestion	-serine-type endopeptidase activity	-extracellular region
2,28	ANK2	ankyrin 2, neuronal	-signal transduction	-structural constituent of cytoskeleton	-actin cytoskeleton -membrane

2,23	CARS	cysteinyl-tRNA synthetase	-translation -cysteinyl-tRNA aminoacylation	-aminoacyl-tRNA ligase activity	-soluble fraction
2,22	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-epidermal growth factor receptor signaling pathway -muscle development -regulation of heart contraction -wound healing, spreading of epidermal cells -positive regulation of smooth muscle cell proliferation -positive regulation of keratinocyte migration	-epidermal growth factor receptor binding -heparin binding	-extracellular space -integral to plasma membrane -cell surface
2,20	TMEM61	transmembrane protein 61	---	---	-integral to membrane
2,19	PGPEP1	pyroglutamyl-peptidase I	-proteolysis	-cysteine-type peptidase activity -hydrolase activity	-cytoplasm
2,11	XBP1	X-box binding protein 1	-regulation of transcription -immune response	-transcription factor activity -protein dimerization activity	-nucleus
2,11	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	-L-serine biosynthetic process -transport -brain development -metabolic process -amino acid biosynthetic process	-phosphoglycerate dehydrogenase activity -transporter activity -oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor -NAD binding	-extracellular region
2,11	CLIC4	chloride intracellular channel 4	-chloride transport -cell differentiation -negative regulation of cell migration	-voltage-gated chloride channel activity	-intracellular soluble fraction -mitochondrion -microvillus -actin cytoskeleton -membrane -cytoplasmic vesicle

2,08	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	-L-serine biosynthetic process -pyridoxine biosynthetic process	-phosphoserine transaminase activity -pyridoxal phosphate binding	---
2,07	SPNS2	spinster homolog 2 (Drosophila)	-transport	-transporter activity	-integral to membrane
2,06	SLC1A4	solute carrier family 1, member 4	-dicarboxylic acid transport -neutral amino acid transport	-sodium:dicarboxylate symporter activity	-integral to membrane
2,01	HERPUD1	-homocysteine-inducible, -endoplasmic reticulum stress-inducible, -ubiquitin-like domain member 1	-cell morphogenesis -ameboidal cell migration -protein modification process -receptor-mediated endocytosis -response to unfolded protein -establishment and/or maintenance of cell polarity -adenylate cyclase activation -actin cytoskeleton organization and biogenesis	-actin binding -adenylate cyclase binding	-cytoplasm -endoplasmic reticulum membrane -integral to membrane -cortical actin cytoskeleton
2,01	FRMD3	FERM domain containing 3	---	-cytoskeletal protein binding	-cytoplasm -cytoskeleton -extrinsic to membrane
2,00	IGSF3	immunoglobulin superfamily, member 3	---	---	---

For these arrays, the annotations derived from public databases include descriptive and functional annotations of the protein sequence from current NCBI releases of the UniGene, LocusLink, OMIM, and HomoloGene databases ([http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/annot\\_method\\_technote.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/annot_method_technote.affx))

**Tabelle 4.1 Ergebnisse des DNA-Mikroarray**

Dargestellt sind alle Gene, deren Expression durch ITF-2B mindestens zweifach induziert wurde (siehe Spalte 1 „*Induction*“) mit biologischen und molekularen Funktionen und Vorkommen der Genprodukte, wie sie in den Erläuterungen (*Annotations*) des Mikroarray-Chip-Herstellers angegeben waren.



### 4.1.2 Eingrenzung der ITF-2B Zielgene

Um die oben aufgeführten 42 Gene auf ein einziges, im Bezug auf die potentielle Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B besonders interessant erscheinendes, Gen einzugrenzen, wurden eine Reihe von Kriterien herangezogen und kritisch beurteilt. Zu Anfang wurden die Gene mit einer Literaturrecherche auf bereits bekannte Funktionen und interessante Zusammenhänge mit Karzinogenese oder Tumorsuppressoreigenschaften untersucht. Für die hiernach relevant erscheinenden Kandidaten wurden die DNA-Mikroarray Ergebnisse mit Hilfe einer qRT-PCR validiert und für diejenigen Gene, deren Expression in der qRT-PCR reproduzierbar durch ITF-2B induzierbar war, wurde außerdem die Expression im Kolon überprüft. Die Kriterien wurden gewichtet und anhand eines Scores wurde die Entscheidung getroffen, welches der Gene weiter untersucht werden sollte.

#### 4.1.2.1 Literaturrecherche

Für die Literaturrecherche wurde die Medizinische Datenbank PubMed.gov (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) verwendet und es wurde nach folgenden Kriterien gesucht:

- Funktion                      Hier wurde besonderes Augenmerk auf Regulation von Transkription, Induktion von Apoptose, Hemmung von Proliferation und Induktion von Zellzyklusarrest gerichtet.
- Zusammenhänge mit kolorektaler Karzinogenese
- Zusammenhänge mit Karzinogenese im Allgemeinen

Es wurden standardisiert für jedes der 42 Gene dieselben Suchanfragen in die Suchmaske eingegeben und die Treffer nach obigen Punkten untersucht. Die Suchanfragen lauteten:

- 1) Name des Gens (Abk.) + *transcription factor activity*
- 2) Name des Gens (Abk.) + *apoptosis*
- 3) Name des Gens (Abk.) + *proliferation*
- 4) Name des Gens (Abk.) + *cell cycle arrest*
- 5) Name des Gens (Abk.) + *colorectal carcinogenesis*
- 6) Name des Gens (Abk.) + *colorectal cancer*
- 7) Name des Gens (Abk.) + *carcinogenesis*
- 8) Name des Gens (Abk.) + *cancer*

Tabelle 4.2 zeigt alle 42 Gene sortiert nach der Anzahl der auf die Suchanfrage gefundenen Publikationen.

	Anzahl Publikationen bei Suchanfrage Nr.								Summe
	1	2	3	4	5	6	7	8	
CDKN1A#	986	3200	3108	2756	40	534	455	5564	16643
TIMP3	11	47	30	3	6	25	27	185	334
XBP1	64	100	23	6	-	5	3	78	279
PHGDH	16	15	26	1	5	21	16	87	187
S100P	5	13	22	1	0	8	6	115	170
AQP3	5	8	29	0	2	3	5	35	87
DDIT4	21	16	10	3	-	1	2	29	82
PRSS1	1	6	2	-	-	-	-	59	68
KISS1R	1	4	4	1	-	-	-	49	59
NUPR1	11	10	9	4	-	-	1	18	53
CLIC4	1	14	8	2	-	-	6	18	49
JDP2	20	2	6	2	-	-	3	15	48
VLDLR	3	2	17	-	-	-	2	19	43
ASNS	3	4	6	1	-	1	1	25	41
HBEGF	2	8	16	2	-	2	1	8	39
PRSS2	-	-	-	-	-	1	-	24	25
SLC16A4	1	3	4	-	1	2	1	9	21
HERPUD1	2	8	2	-	-	-	-	8	20
PTPRE	2	2	3	1	-	-	-	11	19
PCK2	5	1	1	1	-	-	-	5	13
RASSF6	-	5	1	-	-	-	2	5	13
PSAT1	1	1	1	-	-	2	1	6	12
ZNF238	2	3	3	1	-	-	-	2	11
SESN2	-	1	4	1	-	-	-	4	10
CARS*	-	1	1	-	-	-	-	4	6
ANK2	1	-	2	-	-	-	-	2	5
ATOH8	1	-	2	-	-	-	-	1	4
ATP2C2	-	1	1	-	-	-	-	2	4
CAMK2B	1	-	-	-	-	-	-	3	4
FRMD3	-	1	1	-	-	-	-	2	4
IGSF3	1	-	-	-	-	-	-	2	3
MUC20	-	-	1	-	-	-	-	1	2
SLC1A4	-	-	-	-	-	-	-	2	2
MKX	1	-	-	-	-	-	-	-	1
CHAC1	-	1	-	-	-	-	-	-	1
ATP6V1C2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
STAP1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TUBE1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
ATP8B2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
TMEM61	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PGPEP1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
SPNS2	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Tabelle 4.2 Zielgene sortiert nach Anzahl der Publikationen bei Eingabe der Suchanfragen

(#Regulation durch ITF-2B bereits beschrieben (Herbst et al., 2009a), in dieser Arbeit als Positivkontrolle mitgeführt; \*Suchanfrage mit vollem Gennamen)

Die Anzahl der Publikationen stellte allerdings nicht das Hauptauswahlkriterium dar, sondern lieferte lediglich einen Anhaltspunkt für die Relevanz der Gene bezüglich der zu untersuchenden Thematik. So wurden grundsätzlich alle Transkriptionsfaktoren weiter untersucht und einige der Gene wurden aufgrund nur einer einzigen, besonders

überzeugenden Publikation, in die engere Auswahl genommen. Tabelle 4.3 zeigt die 17 Gene, die für weitere Untersuchungen herangezogen wurden mit Begründung.

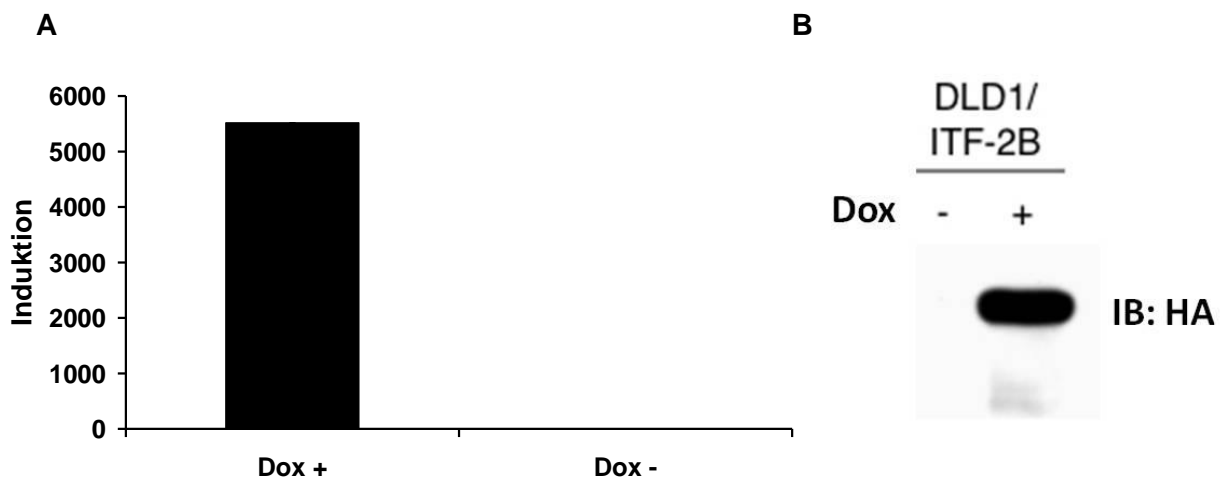
Gen	Begründung
<b>Bezeichnung</b>	
AQP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Inhalt der Publikationen in Bezug auf die Rolle des Genproduktes in der kolorektalen Karzinogenese.</li> </ul>
ATOH8	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transkriptionsfaktor</li> <li><i>basic Helix-Loop-Helix</i>-Protein</li> </ul>
CLIC4	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Publikation (Suh et al., 2007)</li> </ul>
HBEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Beteiligung am EGF-Rezeptor Signalweg</li> <li>Publikation (Kato &amp; Kato, 2006)</li> </ul>
JDP2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transkriptionsfaktor</li> </ul>
KISS1R	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Inhalt der Publikationen in Bezug auf regulative Funktionen des Genproduktes in Bezug auf den Zellzyklus und Apoptose</li> </ul>
MKX	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transkriptionsfaktor</li> </ul>
MUC20	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publikation (Higuchi et al., 2004)</li> <li>Starke Induktion durch ITF-2B im Mikroarray</li> </ul>
NUPR1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transkriptionsfaktor</li> </ul>
PRSS2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publikation (Williams et al., 2001)</li> </ul>
PSAT1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publikation (Vié et al., 2008)</li> </ul>
RASSF6	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beteiligung am RAS-Signalweg</li> </ul>
S100P	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Inhalt der Publikationen in Bezug auf die Rolle des Genproduktes in der kolorektalen Karzinogenese</li> </ul>
SESN2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publikation (Budanov et al., 2002)</li> </ul>
TIMP3	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Inhalt der Publikationen in Bezug auf die Rolle des Genproduktes in der kolorektalen Karzinogenese</li> </ul>
XBP1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anzahl der gefundenen Publikationen</li> <li>Transkriptionsfaktor</li> </ul>
ZNF238	<ul style="list-style-type: none"> <li>Transkriptionsfaktor</li> </ul>

**Tabelle 4.3 Zielgene, die für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden.**

#### 4.1.2.2 qRT-PCR Validierung der Induktion durch ITF-2B

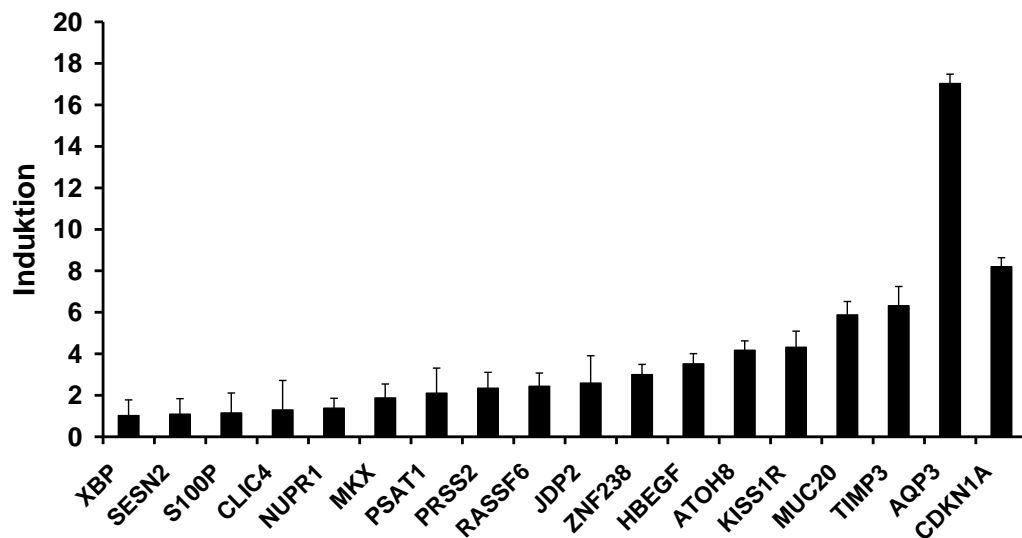
Um die im DNA-Mikroarray gesehene Induktion der nach Literaturrecherche ausgewählten 17 Gene zu validieren, wurde die ITF-2B Expression in DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) (Herbst et al., 2009a) durch Zugabe von Doxycyclin stimuliert. Nach RNA-Extraktion und

Umschreiben in cDNA wurde die Menge der transkribierten Zielgen-mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Durch die Stimulation mit Doxycyclin konnte die Expression von ITF-2B erfolgreich induziert werden (Abb. 4.2). Für 8 der 17 untersuchten Gene (JDP2, ZNF238, HBEGF, ATOH8, KISS1R, MUC20, TIMP3, AQP3) konnte eine Induktion der Expression durch ITF-2B gezeigt werden, die größer als 2,5fach war und somit als signifikant betrachtet wurde (Abb. 4.3). Der Schwellenwert von 2,5 war a priori festgelegt worden. Die qRT-PCR für diese 8 Gene wurde in SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C) (Herbst et al., 2009a) wiederholt. Auch hier konnte die Expression von ITF-2B erfolgreich durch Doxycyclin stimuliert werden (Abb. 4.4), die Induktion der Expression der Zielgene durch ITF-2B ließ sich jedoch nur für ATOH8 reproduzieren (Abb. 4.5). Die Expression der übrigen Gene wurde in SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C) weniger als 2,5fach induziert.



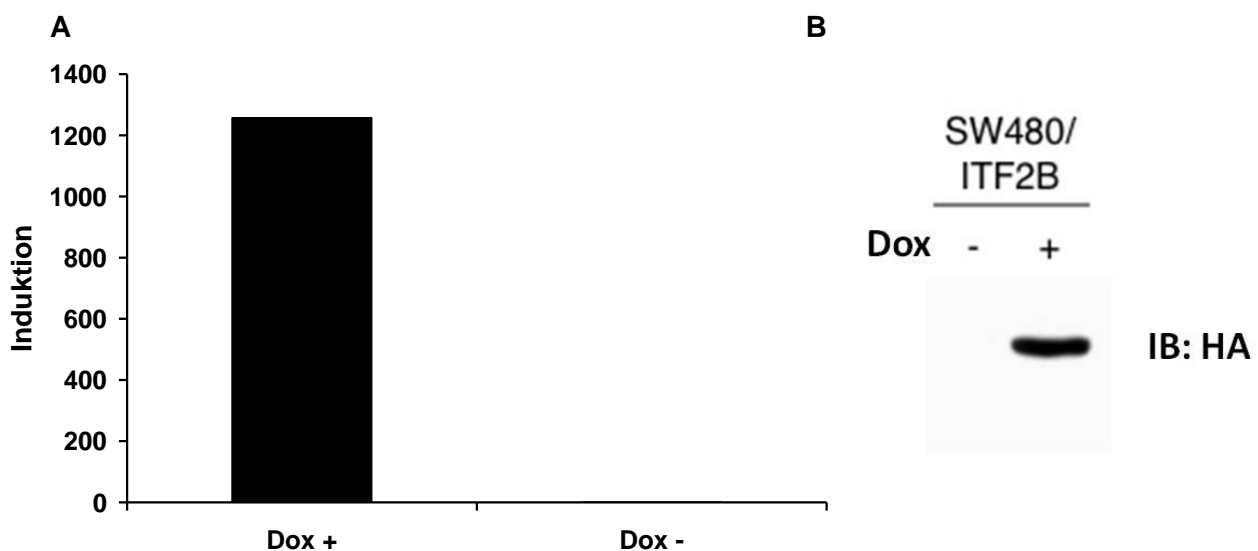
**Abbildung 4.2 Kontrolle der Induktion von ITF-2B nach Stimulation von DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) mit Doxycyclin**

DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert, um die ITF-2B Expression zu induzieren. Die Kontrollzellen wurden nicht stimuliert. Der Erfolg der Induktion wurde mittels qRT-PCR (A) und Western Blot (B) überprüft. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte, indem die Menge an ITF-2B Transkripten in den stimulierten Zellen nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode auf die Menge der ITF-2B Transkripte in den unstimulierten Zellen bezogen wurde. Die Normalisierung der CT-Werte erfolgte auf GAPDH.



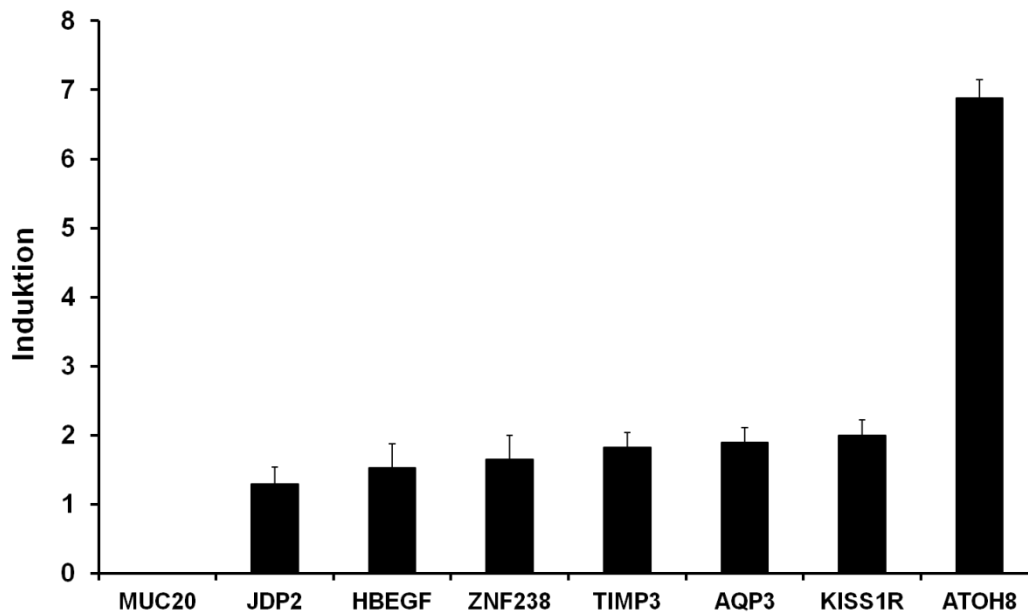
**Abbildung 4.3 Induktion von ITF-2B-Zielgenen in DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1)**

DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert bzw. nicht stimuliert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge der transkribierten Zielgen mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und in Bezug gesetzt zur Menge an transkribierter Zielgen mRNA aus unstimulierten DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1). Die qRT-PCR Daten wurden auf GAPDH normalisiert und mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Standardfehler und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.



**Abbildung 4.4 Kontrolle der Induktion von ITF-2B nach Stimulation von SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C) mit Doxycyclin**

SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert, um die ITF-2B Expression zu induzieren. Die Kontrollzellen wurden nicht stimuliert. Der Erfolg der Induktion wurde mittels qRT-PCR (A) und Western Blot (B) überprüft. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte, indem die Menge an ITF-2B Transkripten in den stimulierten Zellen nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode auf die Menge der ITF-2B Transkripten in den unstimulierten Zellen bezogen wurde. Die Normalisierung der CT-Werte erfolgte auf GAPDH.

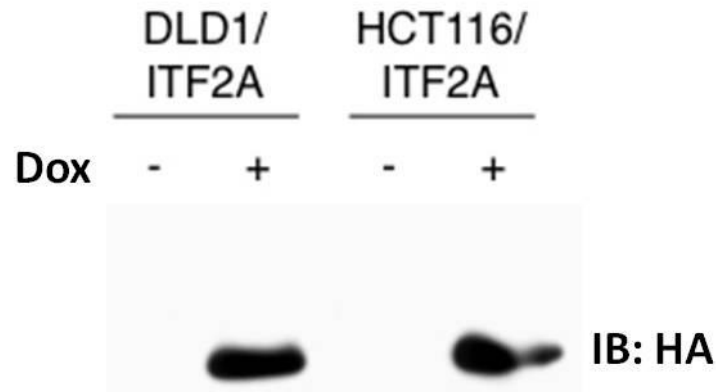


**Abbildung 4.5 Induktion von ITF-2B-Zielgenen in SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C)**

SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge der transkribierten Zielgen mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und in Bezug gesetzt zur Menge an transkribierter Zielgen mRNA aus unstimulierten SW480/ITF-2B-HA Zellen (Klon C). Die qRT-PCR Daten wurden auf GAPDH normalisiert und mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet. Standardfehler und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

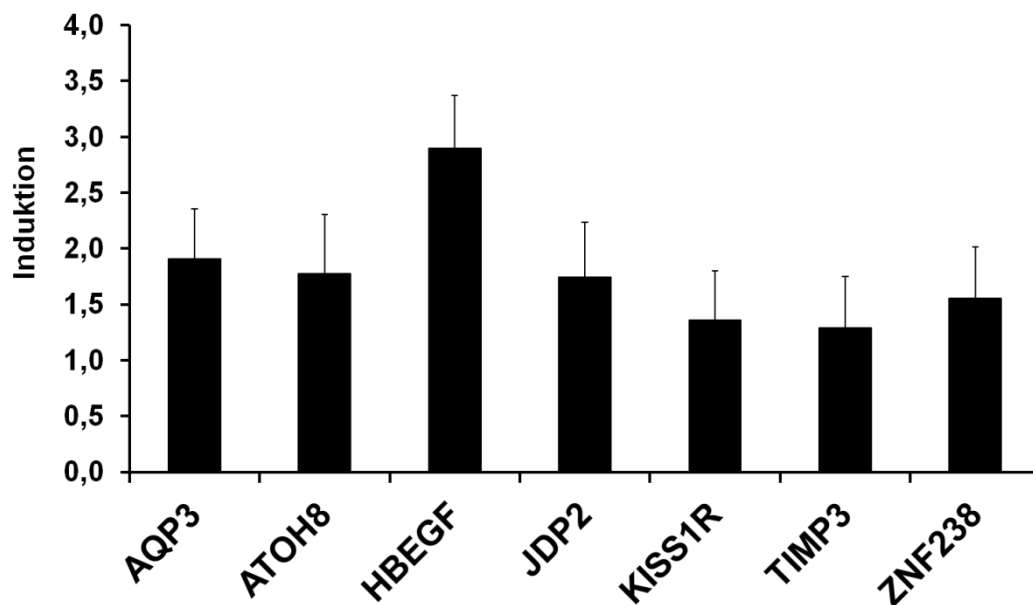
#### 4.1.2.3 qRT-PCR Untersuchung der Induktion durch ITF-2A

Für die 7 Gene (JDP2, ZNF238, HBEGF, ATOH8, KISS1R, TIMP3, AQP3), für welche eine Induktion der Expression durch ITF-2B sowohl in DLD1 als auch in SW480 Zellen gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob die Expression auch durch die zweite ITF-2 Splicevariante, ITF-2A, induziert werden kann. Die Expression von ITF-2A wurde in DLD1/ITF-2A-HA und HCT116/ITF-2A-HA Zellen (Herbst et al., 2009b) durch Zugabe von Doxycyclin stimuliert und der Erfolg der Stimulation mittels Western Blot überprüft (Abb. 4.6). Nach RNA-Extraktion und Umschreiben in cDNA wurde die Menge der transkribierten Zielgen-mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. (Abb. 4.7 und 4.8). Außer für HBEGF in DLD1/ITF2A-HA Zellen konnte für keines der untersuchten Gene eine Induktion der Expression durch ITF-2A gezeigt werden, die oberhalb des a priori festgelegten Schwellenwertes von 2,5 lag.



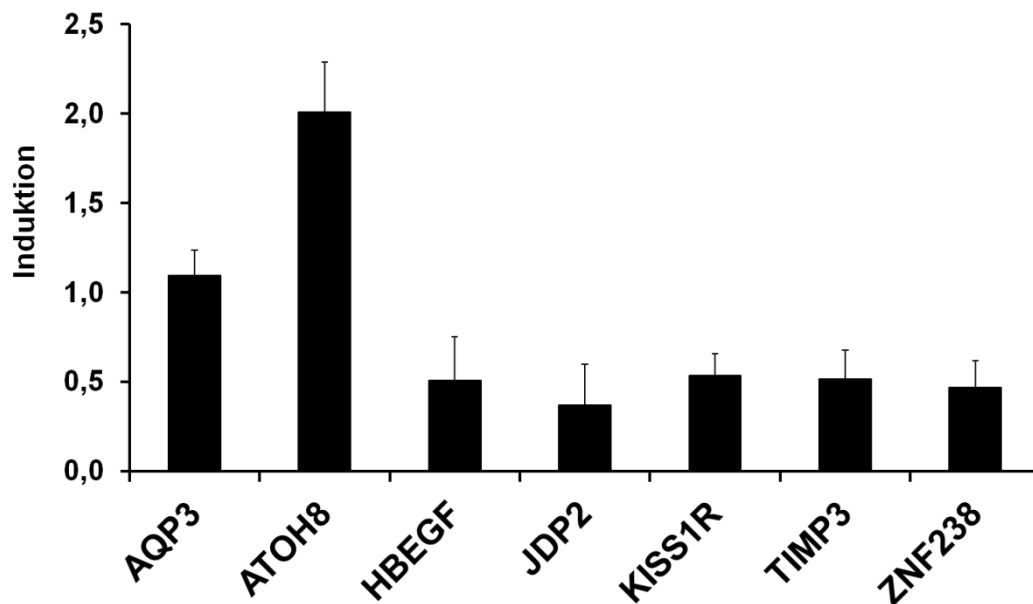
**Abbildung 4.6 Kontrolle der Expression von ITF-2A nach Stimulation von DLD1/ITF-2A-HA und HCT116/ITF-2A-HA Zellen mit Doxycyclin**

DLD1/ITF-2A-HA und HCT116/ITF-2A-HA Zellen wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert bzw. nicht stimuliert und die Expression des ITF-2A Proteins im Western Blot untersucht. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert.



**Abbildung 4.7 Induktion von ITF-2B-Zielgenen durch ITF-2A in DLD1/ITF-2A-HA Zellen**

DLD1/ITF-2A-HA Zellen wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge der transkribierten Zielgen mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und in Bezug gesetzt zur Menge an transkribierter Zielgen mRNA aus unstimulierten DLD1/ITF-2A-HA Zellen. Die qRT-PCR Daten wurden auf GAPDH normalisiert und mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet. Standardfehler und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

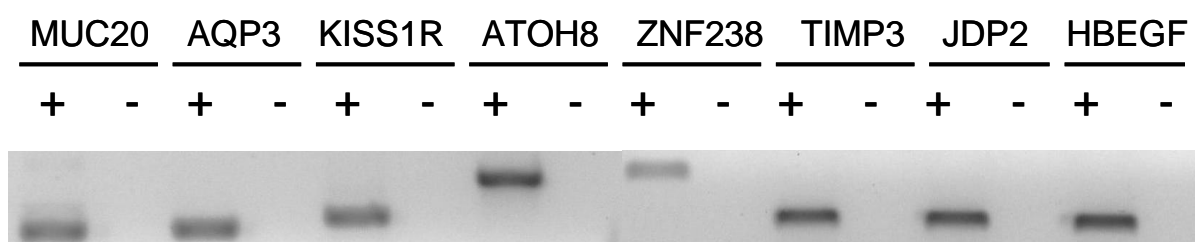


**Abbildung 4.8 Induktion von ITF-2B-Zielgenen durch ITF-2A in HCT116/ITF-2A-HA Zellen**

HCT116/ITF-2A-HA Zellen wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Menge der transkribierten Zielgen mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und in Bezug gesetzt zur Menge an transkribierter Zielgen mRNA aus unstimulierten HCT116/ITF-2A-HA Zellen. Die qRT-PCR Daten wurden auf GAPDH normalisiert und mit der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Standardfehler und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

#### 4.1.2.4 Analyse der Expression der ITF-2B Zielgene im Kolon

Um zu überprüfen, welche der Gene im Kolon exprimiert werden, wurde eine PCR mit Kolonnormalgewebe cDNA durchgeführt. Die Produkte wurden im Agarosegel analysiert (Abb. 4.9).



**Abbildung 4.9 PCR-Analyse der Gene auf Expression im Kolon**

Aus gesundem Kolongewebe wurde RNA extrahiert und diese RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als Template in eine PCR eingesetzt, um die Expression der ITF-2B Zielgene im Kolon zu untersuchen. Dargestellt ist ein Agarosegel mit den PCR-Produkten der untersuchten Gene.

+ Kolon cDNA / - Wasserkontrolle



Es konnte ein PCR-Produkt für alle der untersuchten Gene generiert werden, womit davon ausgegangen werden kann, dass alle 8 Gene im Kolon exprimiert werden.

#### 4.1.2.5 Zusammenfassung aller untersuchten Kriterien

Für die übrig gebliebenen 8 Gene wurden die untersuchten Eigenschaften anhand eines Scores ausgewertet, um die Entscheidung für ein Zielgen, das weiter untersucht werden soll, zu erleichtern. Die Kriterien wurden dabei wie folgt gewichtet:

##### Literaturecherche:

Auswahl aufgrund einer einzigen Publikation	1 Punkt
Auswahl aufgrund Menge der Publikationen	2 Punkte
Auswahl aufgrund Transkriptionsfaktorenaktivität	3 Punkte

##### qRT-PCR Validierung:

Induktion in DLD1/ITF2B Zellen <2,5fach	-1 Punkt
Induktion in DLD1/ITF2B Zellen >2,5fach	1 Punkt
Induktion in SW480/ITF2B Zellen <2,5fach	-1 Punkt
Induktion in SW480/ITF2B-Zellen >2,5fach	1 Punkt

##### Expression im Kolon:

Expression konnte nicht nachgewiesen werden	-1 Punkt
Expression konnte nachgewiesen werden	1 Punkt

Tabelle 4.4 zeigt die Punkteverteilung und die daraus resultierende Rangliste.

Rang	Gen	Literatur	qRT-PCR (DLD1)	qRT-PCR (SW480)	Expression	Summe
1	<b>ATOH8</b>	3	1	1	1	<b>6</b>
2	<b>JDP2</b>	3	1	-1	1	<b>4</b>
3	<b>ZNF238</b>	3	1	-1	1	<b>4</b>
4	<b>AQP3</b>	2	1	-1	1	<b>3</b>
5	<b>KISS1R</b>	2	1	-1	1	<b>3</b>
6	<b>TIMP3</b>	2	1	-1	1	<b>3</b>
7	<b>HBEGF</b>	2	1	-1	1	<b>3</b>
8	<b>MUC20</b>	1	1	-1	1	<b>2</b>

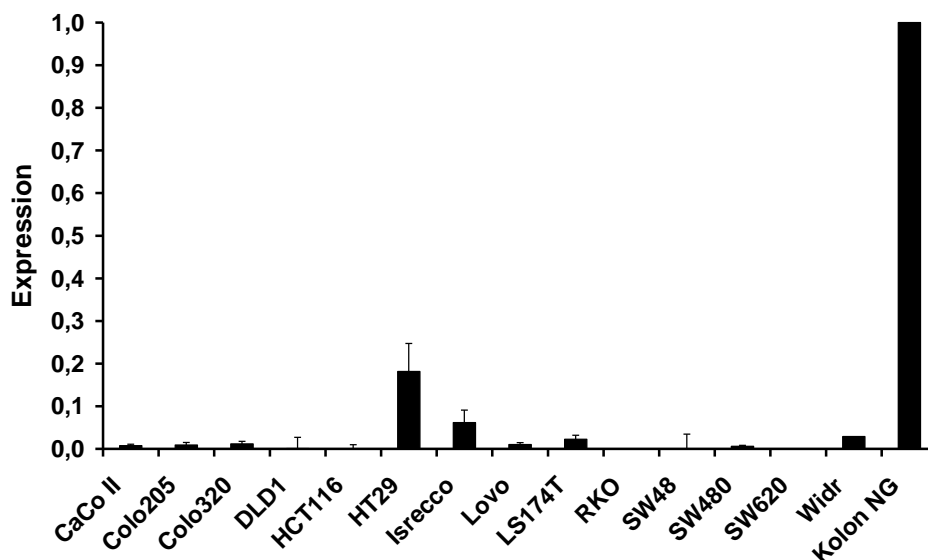
**Tabelle 4.4** Rangliste der 8 Gene nach Kriteriengewichtung

Aufgrund der dargestellten Rangliste (Tab. 4.4) nach Berechnung des Scores, wurde ATOH8 als das Zielgen ausgewählt, das weiter untersucht werden sollte. Hauptgründe für das Ergebnis der Scoreauswertung und die Entscheidung für ATOH8 waren die Reproduzierbarkeit der Induktion durch ITF-2B in zwei verschiedenen Zelllinien und die Funktion von ATOH8 als bHLH-Transkriptionsfaktor.

## 4.2 Charakterisierung des ATOH8 Promotors

### 4.2.1 Auswahl geeigneter Zelllinien für die Reporterassays

Um genau festlegen zu können, an welche E-Box bzw. E-Boxen im ATOH8 Promotor ITF-2B bindet, wurden Reporterassays durchgeführt. Da für die Reporterassays nur Zelllinien geeignet sind, die eine geringe endogene ATOH8 Expression besitzen, wurde ein Expressionsprofil für ATOH8 in den gängigen Kolonkarzinom-Zelllinien erstellt. Die ATOH8 Expression wurde hierfür mittels qRT-PCR quantifiziert und zur ATOH8 Expression in Kolonnormalgewebe (Kolon-NG) ins Verhältnis gesetzt (Abb 4.10)



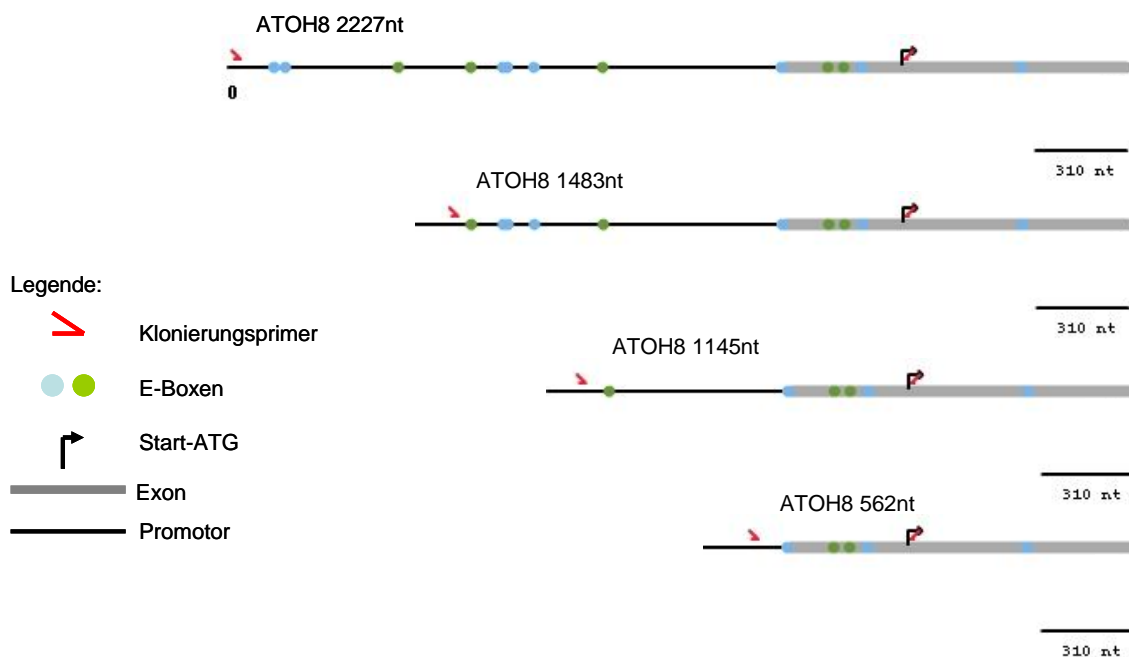
**Abbildung 4.10** Expressionsprofil für ATOH8 in gängigen Kolonkarzinom-Zelllinien

Die Expression von ATOH8 wurde mittels qRT-PCR in 14 gängigen Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht und zur ATOH8 Expression in Kolonnormalgewebe (Kolon-NG) ins Verhältnis gesetzt. Hierfür wurde aus allen Zelllinien und aus den Gewebeproben RNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben und als *Template* in einer qRT-PCR eingesetzt. Die qRT-PCR Daten wurden auf GAPDH normalisiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Die Auswertung des Expressionsprofils ergab, dass sämtliche untersuchten Zelllinien ATOH8 in einem sehr geringen Maße exprimieren. Die höchste Expression zeigten HT29-Zellen mit knapp 20% des Levels der Expression in Kolon-NG. Überhaupt keine Expression konnte in RKO-Zellen und SW620-Zellen nachgewiesen werden. In den übrigen Zelllinien bewegte sich das Level der Expression zwischen 1% und 6% verglichen mit der Expression von ATOH8 in Kolon-NG. Für die Reporterassays wurden DLD1-Zellen gewählt, da sie eine geringe endogene ATOH8 Expression (0,7% im Vergleich zu Kolon-NG) aufwiesen und da der DNA-Mikroarray und die qRT-PCR-Validierung auch schon in DLD1-Zellen durchgeführt worden waren.

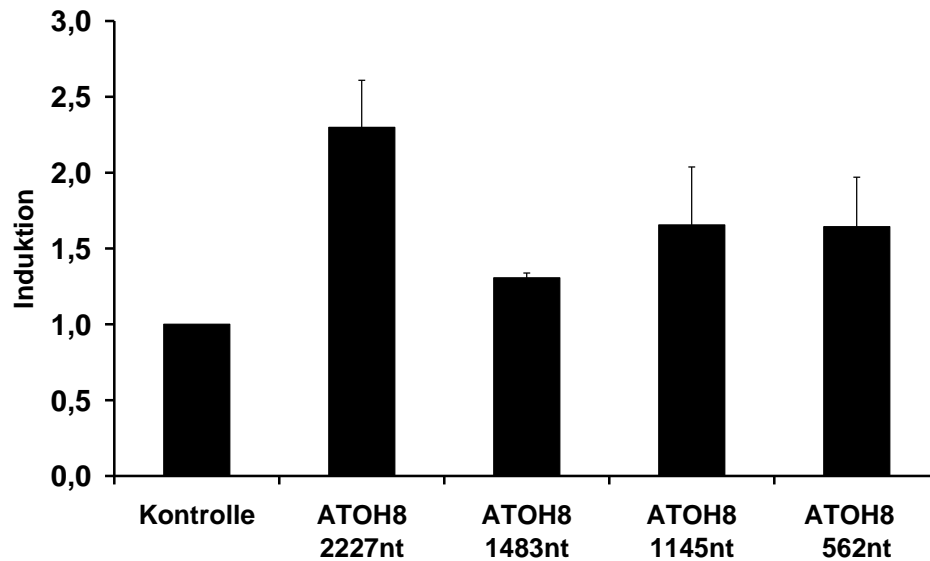
#### 4.2.2 Identifikation von ITF-2B Bindungsstellen am ATOH8 Promotor

Für die Reporterassays wurde der ATOH8 Promotor in kürzer werdende Fragmente zerlegt (Abb. 4.11). Die Fragmente wurden in einen Luziferase-Vektor kloniert und ihre Aktivierung durch ITF-2B im Reporterassay überprüft (Abb 4.12).



**Abbildung 4.11 ATOH8 Promotorfragmente**

Dargestellt sind Abschnitte des ATOH8-Gens mit erstem kodierendem Exon, Start-ATG und allen in diesen Abschnitten vorkommenden E-Boxen. Der Promotorbereich bis knapp 2230 Nukleotide oberhalb des Start-ATG wurde in kürzer werdende Fragmente zerlegt (Klonierungsprimere sind in rot dargestellt) und die Fragmente wurden vor das Luziferasegen in einen pGL3-Basic Vektor kloniert.



**Abbildung 4.12 Aktivierung der ATOH8 Promotrofragmente durch ITF-2B**

Die Reporterengenkonstrukte mit den ATOH8-Promotorfragmenten wurden in DLD1-Zellen entweder mit Leervektor (Kontrolle) oder einem konstitutiv-aktiven Expressionskonstrukt für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) transient kotransfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

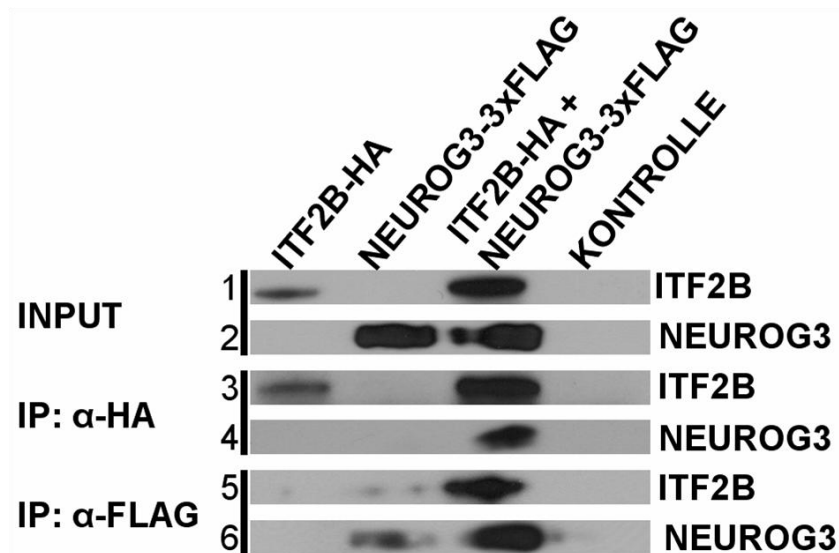
Für keines der untersuchten Promotorfragmente konnte eine Steigerung der Luziferaseaktivität von 2,5fach oder mehr gezeigt werden. Daraus ergab sich die Theorie, dass ITF-2B einen weiteren bHLH-Transkriptionsfaktor als Interaktionspartner benötigt, um die Expression von ATOH8 zu induzieren.

#### 4.2.3 ITF-2B benötigt NeuroG3 als Interaktionspartner

Lynn et al. beschrieben 2008, dass das Maus-Ortholog von ATOH8 (MATH6) ein Zielgen des bHLH-Transkriptionsfaktors NeuroG3 darstellt (Lynn et al., 2008). Da ATOH8 und MATH6 eine 88%ige Homologie in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen, wurde angenommen, dass Ergebnisse für MATH6 auf ATOH8 übertragbar sein könnten und ITF-2B NeuroG3 als Interaktionspartner benötigt, um an den ATOH8 Promotor zu binden und die Expression von ATOH8 zu induzieren. Die Theorie wurde weiter gestützt durch die Tatsache, dass es sich bei allen drei Molekülen um bHLH-Transkriptionsfaktoren handelt, bei denen man aus der Entwicklung verschiedener Gewebearten weiß, dass sie gerne Netzwerke untereinander ausbilden und sich gegenseitig regulieren (Persson et al., 2000; Bhattacharya & Baker, 2011).

#### 4.2.3.1 Physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3

Ob eine physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3 vorliegt, wurde mittels Co-Immunopräzipitationen (CoIP) überprüft (Abb. 4.13).



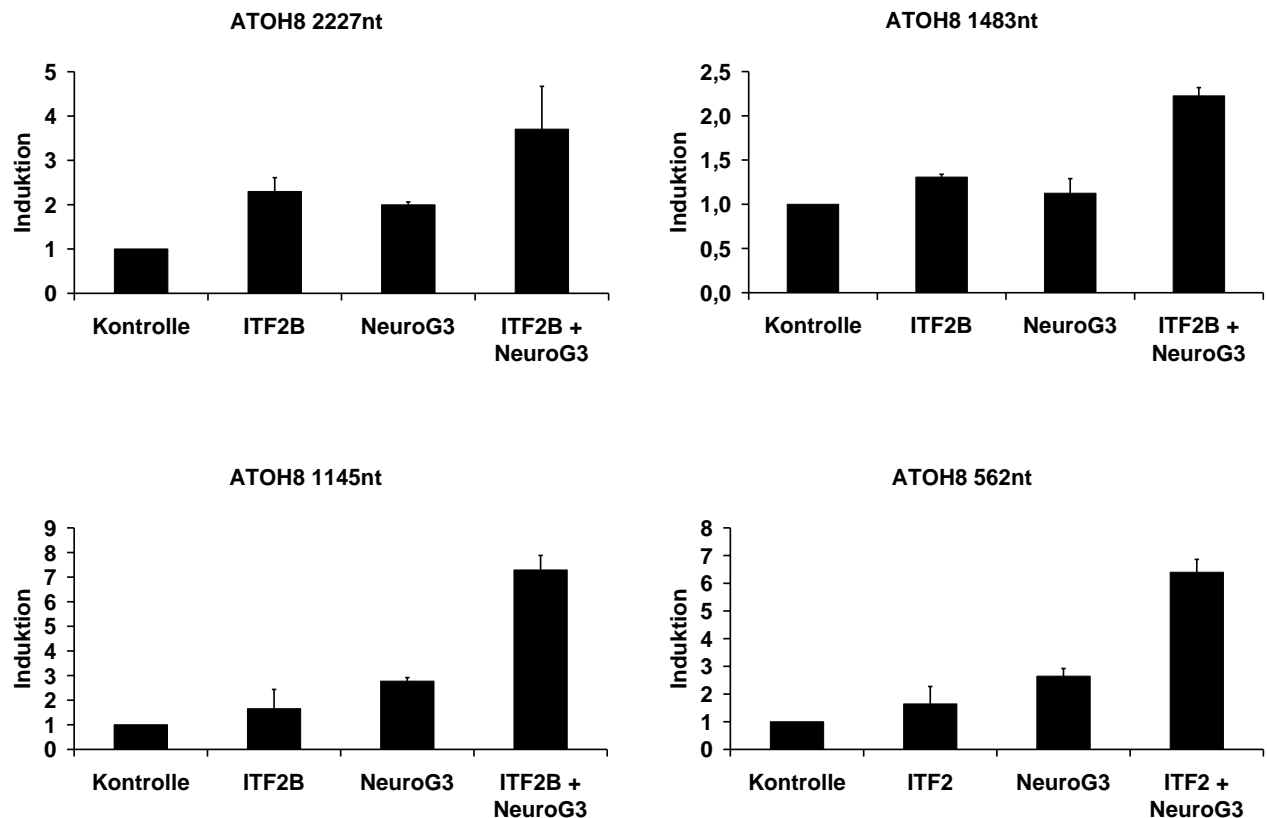
**Abbildung 4.13 Nachweis einer Physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3**

Für die CoIP wurden HEK293 Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionssystemen für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert. Die Proteine in den Zelllysaten wurden immunopräzipitiert, vorher wurde zur Kontrolle ein Aliquot entnommen (Input: Zeilen 1 und 2). Die Immunopräzipitation wurde entweder mit einem HA-Antikörper (Zeilen 3 und 4) oder einem FLAG-Antikörper (Zeilen 5 und 6) durchgeführt. In beiden Fällen konnte das nicht entsprechend markierte Protein copräzipitiert und im Western Blot detektiert werden. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert.

Die Tatsache, dass bei der Immunopräzipitation mit einem HA-Antikörper (Abb. 4.13 Zeilen 3 und 4) NeuroG3 copräzipitiert werden konnte, obwohl es kein HA-Tag trug, und bei der Immunopräzipitation mit einem FLAG-Antikörper (Abb. 4.13 Zeilen 5 und 6) ITF-2B mitgefällt wurde, obwohl ITF-2B kein FLAG-Tag trug, lässt auf eine physikalische Interaktion der beiden Proteine schließen.

#### 4.2.3.2 Funktionelle Interaktion von ITF-2B und NeuroG3

Um neben der physikalischen Interaktion eine funktionelle nachzuweisen, wurden erneut Reporterergenassays mit den ATOH8 Promotorkonstrukten (Abb. 4.11) durchgeführt (Abb. 4.14).



**Abbildung 4.14 Nachweis einer funktionellen Interaktion von ITF-2B und NeuroG3**

Die Reporterergenkonstrukte wurden in DLD1-Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Für die längeren Konstrukte „ATOH8 2227nt“ und „ATOH8 1483nt“ konnte kein funktioneller Synergismus von ITF-2B und NeuroG3 nachgewiesen werden. Der Effekt der Kombination der Transkriptionsfaktoren ITF-2B und NeuroG3 auf die Aktivierung der genannten Promotorfragmente war lediglich additiv und für das Konstrukt „ATOH8 1483nt“ konnte der Grenzwert von einer mindestens 2,5fachen Induktion nicht erreicht werden. Bei den kürzeren Konstrukten „ATOH8 1145nt“ und „ATOH8 562nt“ war der Effekt der Kombination von ITF-2B und NeuroG3 auf die Induktion der Luziferaseaktivität mehr als additiv verglichen mit der Induktion, die erreicht wurde, wenn ITF-B und NeuroG3 einzeln transfiziert wurden.

Insgesamt wurden durch die Kombination der Transkriptionsfaktoren Induktionswerte von 6fach bis 8fach erreicht.

#### 4.2.4 Identifikation von Bindungsstellen des ITF-2B/NeuroG3-Heterodimers am ATOH8 Promotor

##### 4.2.4.1 Funktionelle Untersuchung des ATOH8 Promotors

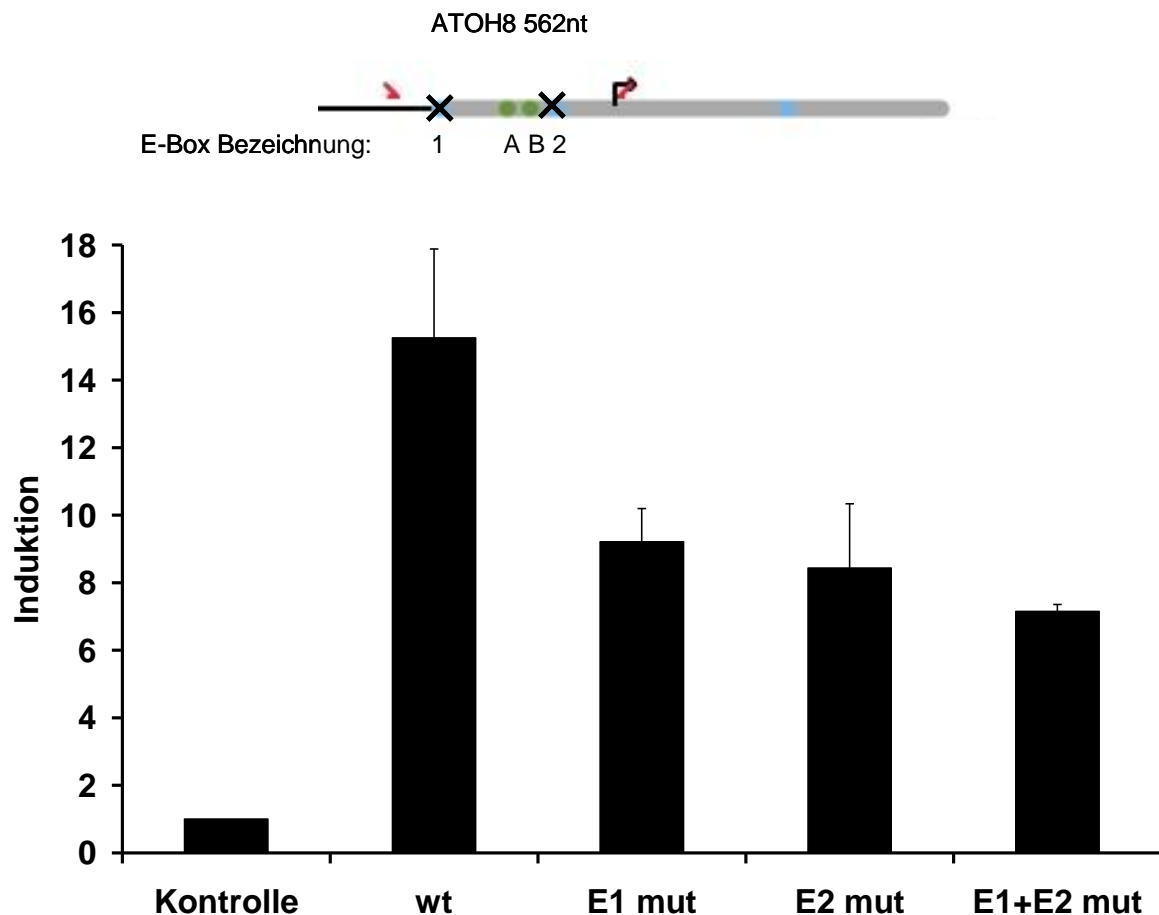
Um genau festzulegen, über welche E-Boxen die Bindung des ITF-2B/NeuroG3-Heterodimers am ATOH8 Promotor läuft, wurde das Reportergenkonstrukt mit dem kürzesten der Promotorfragmente („ATOH8 562nt“) näher charakterisiert. Das ATOH8-562nt-Konstrukt enthält noch vier E-Boxen, die alle potentielle Bindungsstellen des Heterodimers sind (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15 Promotorfragment ATOH8 562nt**

Dargestellt ist ein Abschnitt des ATOH8 Gens mit erstem kodierendem Exon und Start-ATG. Die Klonierungsprimere umrahmen das Promotorfragment „ATOH8 562nt“, das vier E-Boxen enthält. Zwei dieser E-Boxen (E-Box 1 und 2, blaue Punkte) weisen eine gewisse ITF-2B-Spezifität auf, während die anderen zwei E-Boxen (E-Box A und B, grüne Punkte) eher von NeuroG3 erkannt werden.

ITF-2B und NeuroG3 gehören unterschiedlichen Klassen von bHLH-Transkriptionsfaktoren an und binden daher mit einer gewissen Spezifität an bestimmte E-Boxen. E-Boxen, die eher von ITF-2B erkannt werden haben die Sequenz CA(G/C)CTG (Murre et al., 1994) und sind in blau dargestellt, E-Boxen mit einer gewissen Spezifität für NeuroG3 haben die Sequenz CAGATG (Lynn et al., 2008) und sind als grüne Punkte dargestellt. Die E-Boxen wurden einzeln und in Kombination mutiert und die Aktivität der mutierten Konstrukte in Reporterassays überprüft (Abb. 4.16 – 4.18).

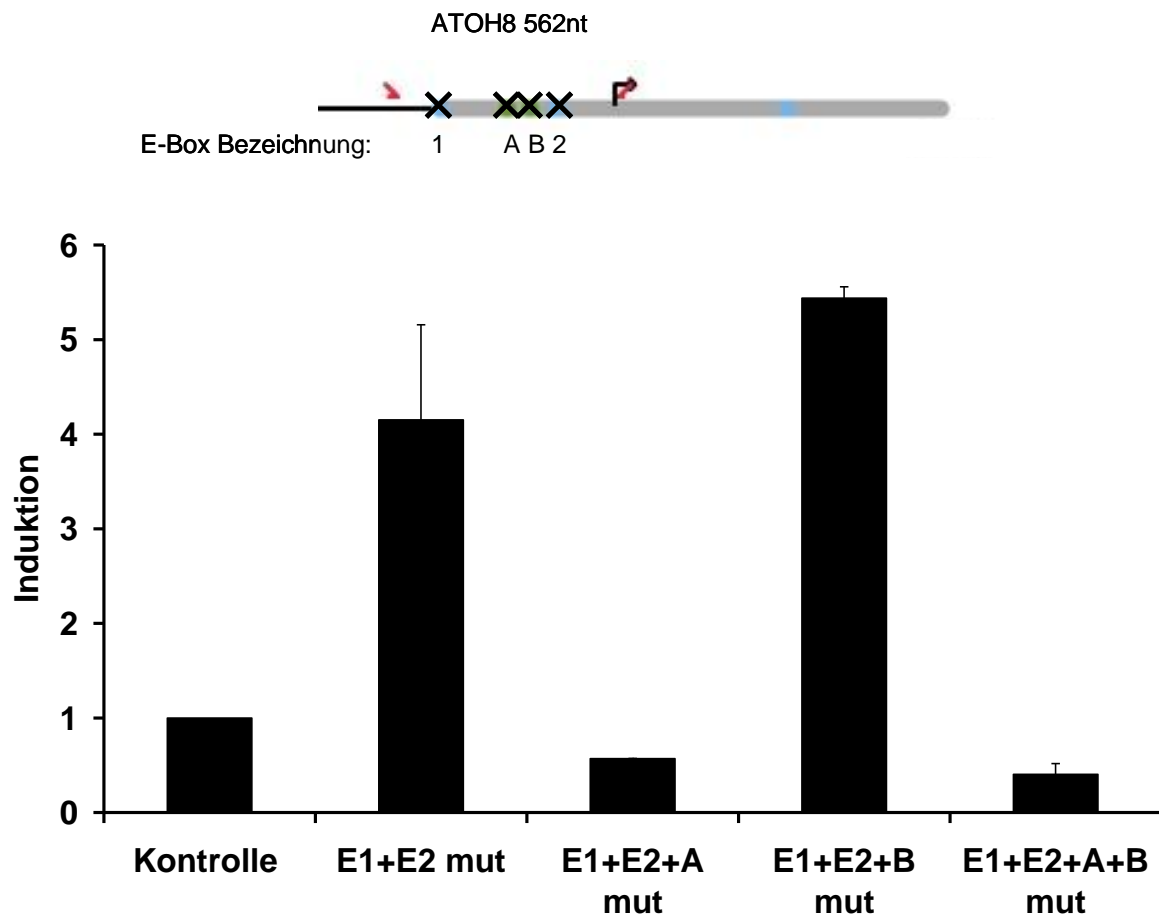


**Abbildung 4.16 Mutation der ITF-2B E-Boxen E1 und E2**

Die Sequenzen der E-Boxen E1 und E2 wurden mit Hilfe einer Mutations-PCR von CA(G/C)CTG zu CAGCAT geändert und die mutierten Konstrukte wurden entweder mit Leervektor (Kontrolle) oder mit der Kombination der konstitutiv aktiven Expressionkonstrukte von ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) in DLD1-Zellen transient kotransfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Die Mutation der ITF-2B E-Boxen E1 und E2 führte lediglich zu einer leichten Reduktion der Induktion der Luziferaseaktivität. Im Wildtyp-Konstrukt lag die Induktion bei etwa 15fach und fiel bei den Einzelmутanten auf Werte von 8fach bis 9fach. In der Doppelmutante konnte eine Reduktion der Induktion auf 50% des Wildtypwertes gezeigt werden. Erwartet wurde allerdings bei Mutation der E-Box, über welche das Heterodimer aus ITF-2B und NeuroG3 an den ATOH8 Promotor bindet, eine Reduktion der Induktion auf das Kontrolllevel. Daher wurden zusätzlich zu den ITF-2B E-Boxen E1 und E2 die NeuroG3 E-Boxen A und B mutiert und erneut Reporterassays in DLD1-Zellen durchgeführt (Abb. 4.17).

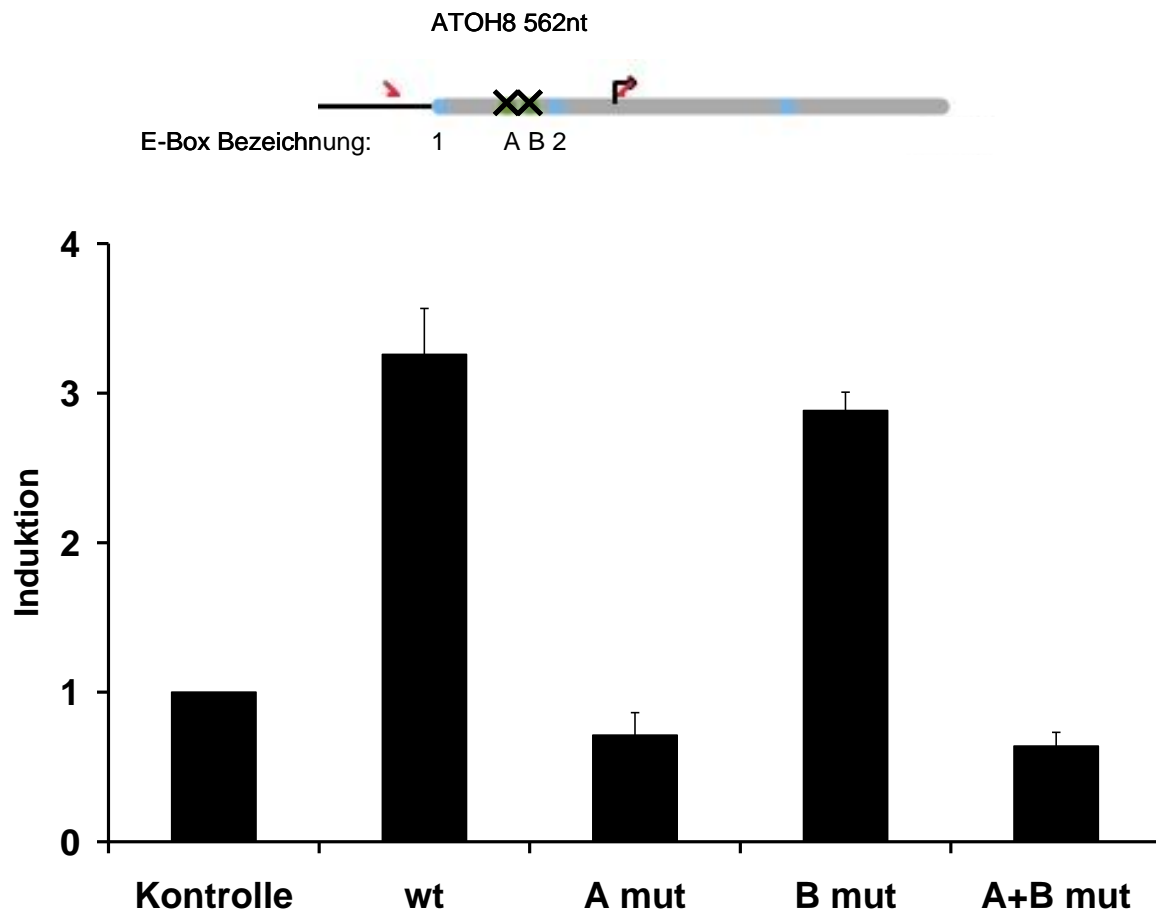




**Abbildung 4.17      Zusätzliche Mutation der NeuroG3 E-Boxen A und B**

Zusätzlich zu den ITF-2B E-Boxen E1 und E2 wurden Sequenzen der NeuroG3 E-Boxen A und B von CAGATG zu GAGCAT geändert. Die veränderten Konstrukte wurden entweder mit Leervektor (Kontrolle) oder mit der Kombination der konstitutiv aktiven Expressionkonstrukte von ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) in DLD1-Zellen transient kotransfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Auf dem Hintergrund der Doppelmutante der ITF-2B E-Boxen E1 und E2 führt eine zusätzliche Mutation der NeuroG3 E-Box A alleine und in Kombination mit der Mutation der E-Box B zu einem signifikanten Abfall der Induktion der Luziferasewerte unter das Kontrolllevel. Eine zusätzliche Mutation der NeuroG3 E-Box B alleine veränderte die Induktion der Luziferasewerte kaum. Um die Relevanz der NeuroG3 E-Box A noch einmal zu überprüfen, wurden die NeuroG3 E-Boxen A und B auch im Wildtyp-Hintergrund mutiert und die Aktivität der Konstrukte wiederum im Reporterassay überprüft (Abb. 4.18).



**Abbildung 4.18 Mutation der NeuroG3 E-Boxen A und B**

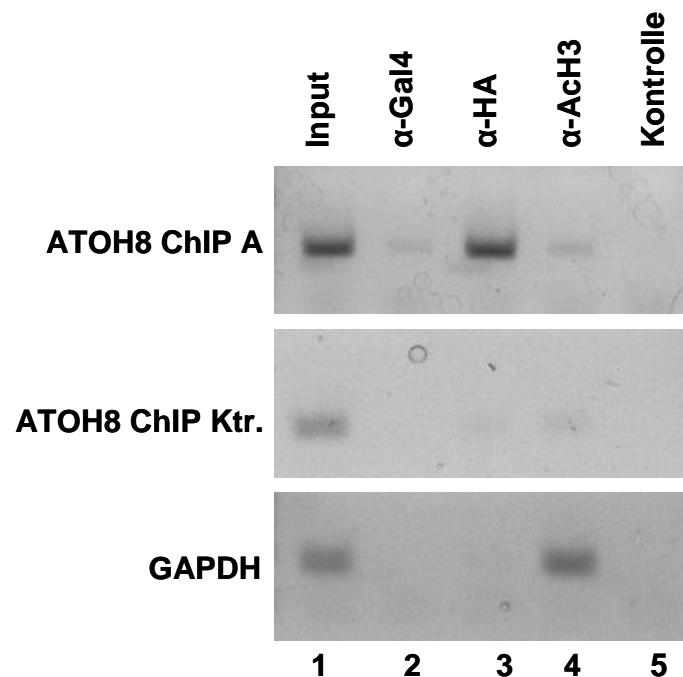
Die Sequenzen der E-Boxen A und B wurden mit Hilfe einer Mutations-PCR von CAGATG zu CAGCAT geändert und die mutierten Konstrukte wurden entweder mit Leervektor (Kontrolle) oder mit der Kombination der konstitutiv aktiven Expressionkonstrukte von ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) in DLD1-Zellen transient kotransfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Die Auswertung der dargestellten Reporterassays (Abb. 4.16 – 4.18) ergab, dass die Mutation der eher NeuroG3 spezifischen E-Box A sowohl alleine, als auch in Kombination mit Mutationen in den anderen E-Boxen zu einem signifikanten Abfall der Aktivierung des Promotorkonstruktes „ATOH8 562nt“ durch das Heterodimer aus ITF-2B und NeuroG3 führt.

#### 4.2.4.2 Physikalische Untersuchung des ATOH8 Promotors

Den funktionellen Untersuchungen des ATOH8 Promotors wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation angeschlossen, um auch eine physikalische Interaktion des ITF-

2B/NeuroG3-Heterodimers mit dem ATOH8 Promotor im Bereich der für die Bindung des Heterodimers verantwortlich erscheinenden E-Box A nachzuweisen (Abb. 4.19).



**Abbildung 4.19 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

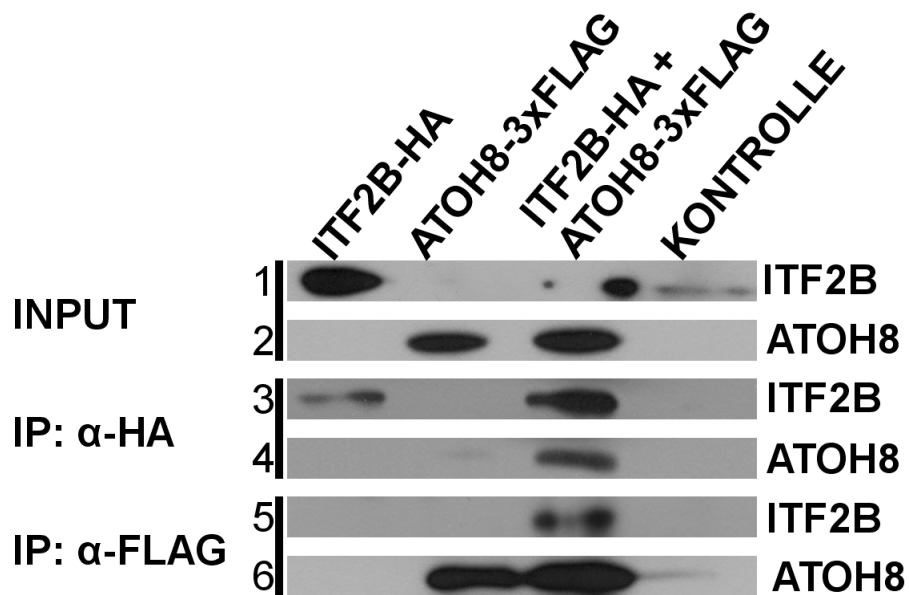
Die physikalische Bindung von ITF-2B an E-Boxen direkt oberhalb des Start-ATG wurde anhand einer ChIP überprüft. DLD1/ITF-2B-HA Zellen (Klon B1) wurden 48h mit Docycyclin stimuliert, Chromatin wurde mit den in der Abbildung angegeben Antikörpern präzipitiert und mithilfe eines Primerpaares analysiert, dass die E-Boxen 2, A und B flankiert (ATOH8 ChIP A). Als Kontrolle diente ein Primerpaar, das hinter Exon 2 an das ATOH8-Gen bindet (ATOH8 ChIP Ktr.) und ein Primerpaar zum Nachweis von GAPDH. Für die genaue Lokalisation der verwendeten Primerpaare siehe Abb. 3.2 auf S. 43. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert.

Aus dem Chromatin, an welches ITF-2B gebunden vorlag, und welches daher mit einem anti-HA Antikörper präzipitiert werden konnte, konnten wir mit einem spezifischen Primerpaar (ATOH8 ChIP A), das den Promotorbereich um E-Box A abdeckt (Abb. 3.2 auf S.43), ein PCR-Produkt generieren. Mit dem Kontrollprimerpaar (ATOH8 ChIP Ktr.) wurde kein PCR-Produkt generiert. Es ist daher davon auszugehen, dass eine physikalische Bindung von ITF-2B an den ATOH8 Promotor im Bereich der E-Box A stattfindet. Die Bindung von NeuroG3 an den ATOH8 Promotor im Bereich der E-Box A wurde von Lynn et al. gezeigt (Lynn et al., 2008).

### 4.3 Interaktion von ATOH8 mit ITF-2B und NeuroG3

#### 4.3.1 Physikalische Interaktion von ATOH8 und ITF-2B

In einer Co-Immunopräzipitation konnten wir zeigen, dass ITF-2B nicht nur in der Lage ist die Expression von ATOH8 zu induzieren, sondern dass ITF-2B und ATOH8 auch auf Proteinebene interagieren (Abb. 4.20)



**Abbildung 4.20 Nachweis einer Physikalische Interaktion von ITF-2B und ATOH8**

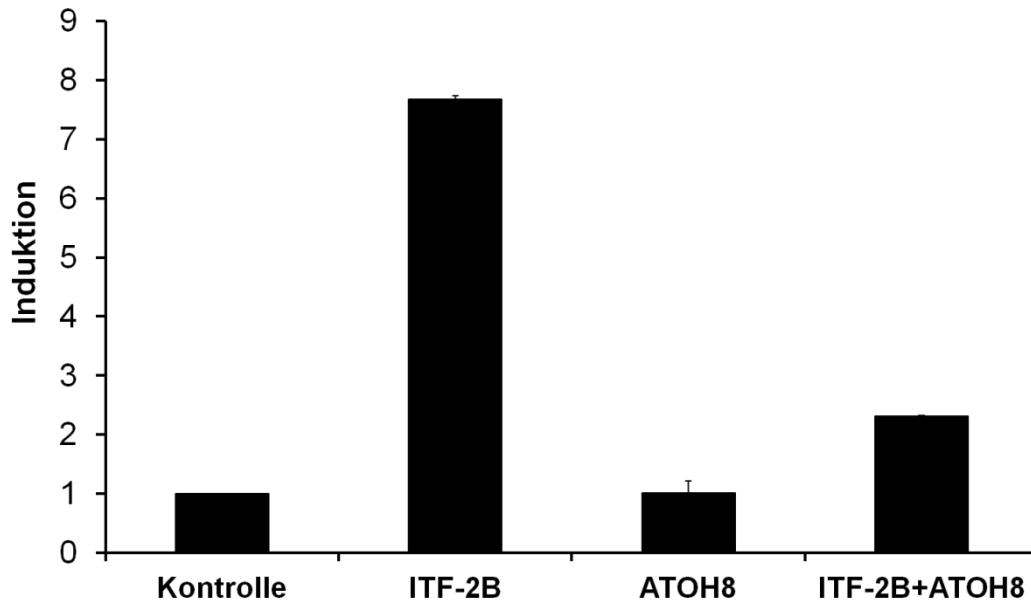
Für die CoIP wurden HEK293 Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionssystemen für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert. Die Proteine in den Zelllysaten wurden immunopräzipitiert, vorher wurde zur Kontrolle ein Aliquot entnommen (Input: Zeilen 1 und 2). Die Immunopräzipitation wurde entweder mit einem HA-Antikörper (Zeilen 3 und 4) oder einem FLAG-Antikörper (Zeilen 5 und 6) durchgeführt. In beiden Fällen konnte das nicht entsprechend markierte Protein copräzipitiert und im Western Blot detektiert werden. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert.

Auf dieses Ergebnis hin entstand die Theorie, dass ATOH8 in einer Art *Feedback* Mechanismus die transkriptionelle Aktivität von ITF-2B beeinflussen könnte.

#### 4.3.2 Funktionelle Interaktion von ATOH8 mit ITF-2B und NeuroG3

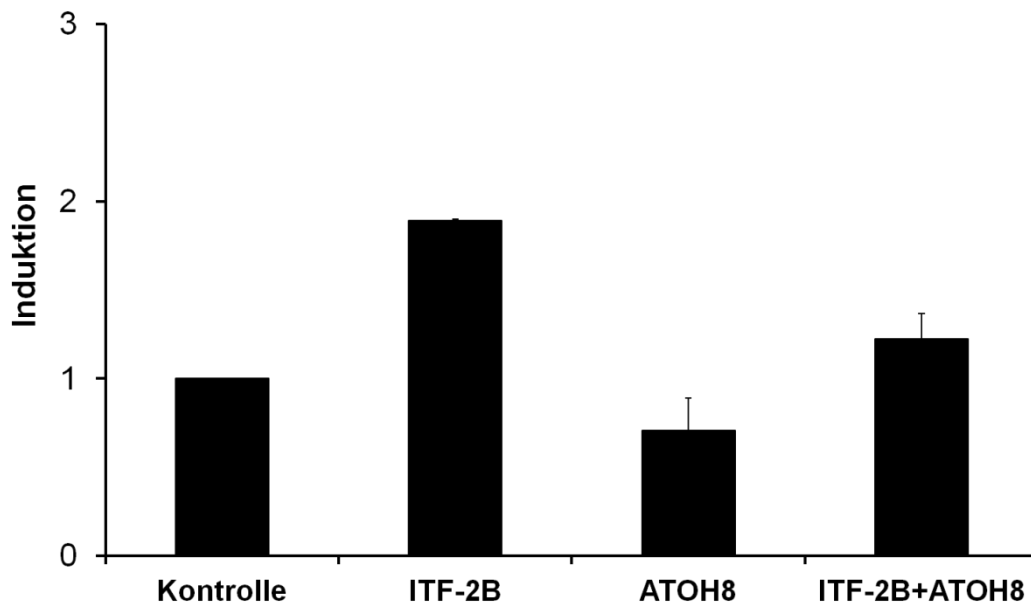
Um einer möglichen *Feedback* Regulation von ITF-2B durch sein eigenes Zielgen ATOH8 auf den Grund zu gehen, wurden Reporterassays durchgeführt. Als Reporterassay wurde zunächst ein artifizielles Promotorkonstrukt (pE7- $\beta$ A-luc Akazawa et al., 1995) verwendet

(Abb. 4.21). Zusätzlich wurde das Experiment dann mit dem Promotorkonstrukt „ATOH8 562nt“ durchgeführt, um zu überprüfen, ob das ATOH8 Protein die Aktivierung seines eigenen Promotors beeinflusst (Abb. 4.22).



**Abbildung 4.21** Untersuchung einer funktionellen Interaktion von ITF-2B und ATOH8 mit Hilfe des artifiziellen Promotorkonstruktes pE7- $\beta$ A-luc (Akazawa et al., 1995)

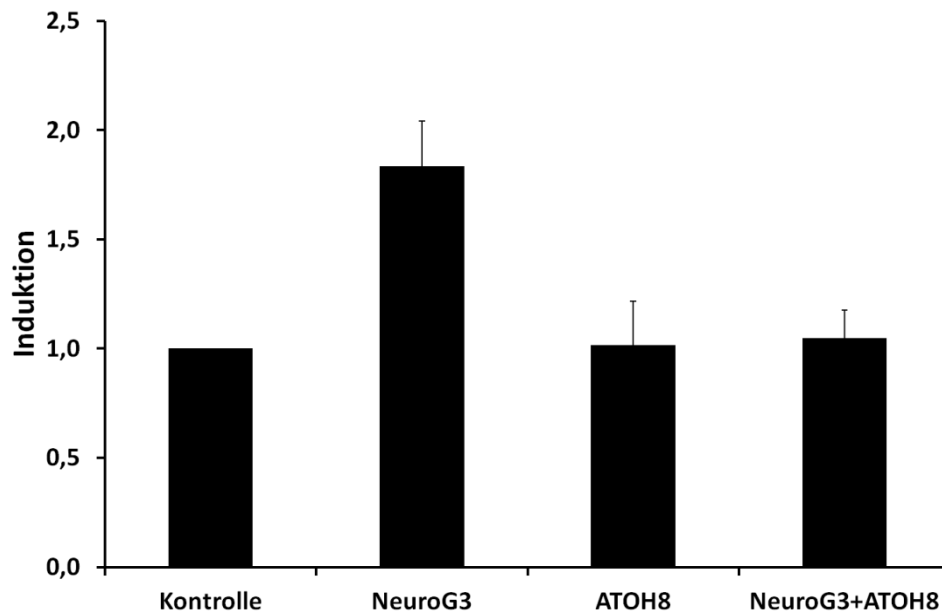
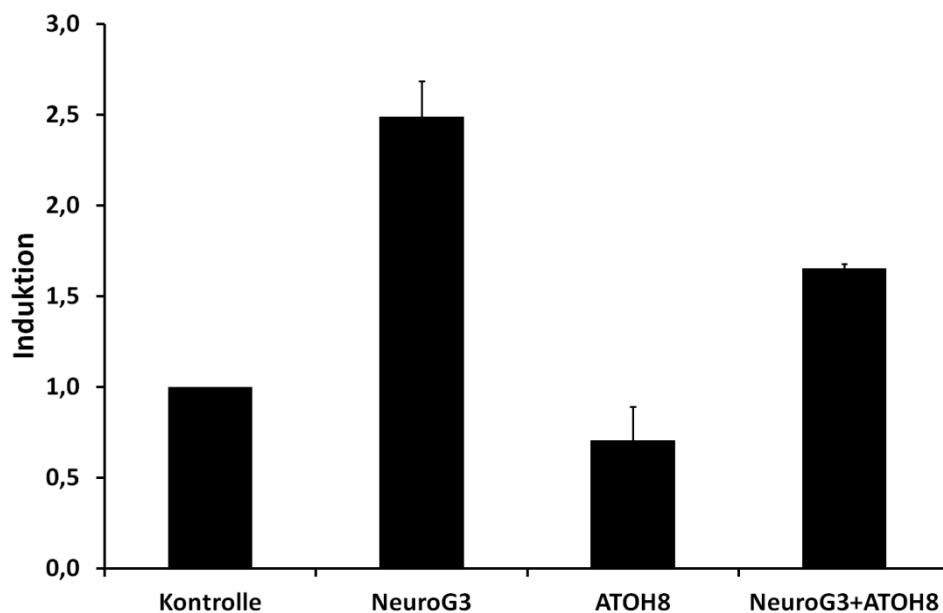
Das Reportergenkonstrukt pE7- $\beta$ A-luc (Akazawa et al., 1995) wurde in DLD1-Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.



**Abbildung 4.22** Untersuchung einer funktionellen Interaktion von ITF-2B und ATOH8 mit Hilfe des Promotorkonstruktes „ATOH8 562nt“

Das Reporterogenkonstrukt „ATOH8 562nt“ wurde in DLD1-Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

In beiden Experimenten scheint ATOH8 die transkriptionelle Aktivität von ITF-2B zu reduzieren. Eine solche negative *Feedback* Funktion von ATOH8 wurde von Lynn et al. bereits für NeuroG3 und ATOH8 vorgeschlagen (Lynn et al., 2008). Wir konnten in Reporterogenassays reproduzieren, dass ATOH8 auch auf die transkriptionelle Aktivität von NeuroG3 einen inhibierenden Einfluss zu haben scheint (Abb. 4.23).

**A****B**

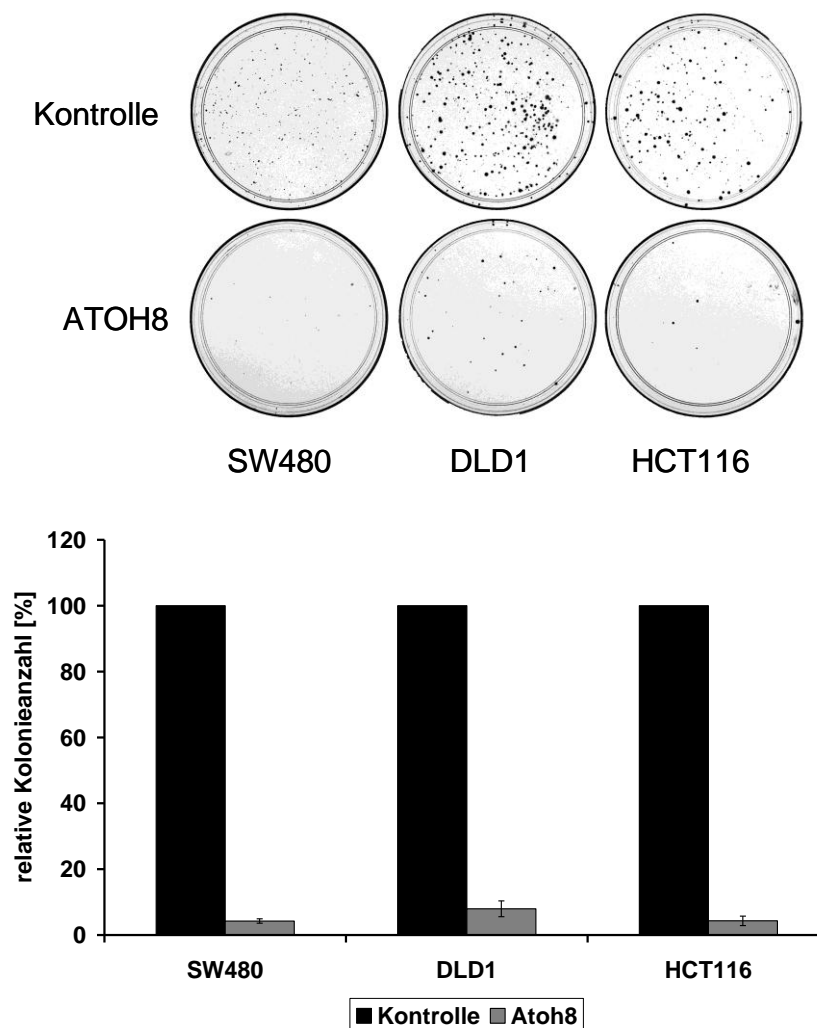
**Abbildung 4.23** Untersuchung einer funktionellen Interaktion von NeuroG3 und ATOH8 mit Hilfe des artifiziellen Promotorkonstruktes pE7-βA-luc (Akazawa et al., 1995) (A) und mit Hilfe des Promotorkonstruktes „ATOH8 562nt“ (B)

Die Reportergenkonstrukte pE7-βA-luc (Akazawa et al., 1995) (A) und „ATOH8 562nt“ (B) wurden in DLD1-Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten für NeuroG3 (pcDNA3/NeuroG3-3xFLAG) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf β-Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

## 4.4 Untersuchung der Funktion von ATOH8

### 4.4.1 ATOH8 inhibiert die Koloniebildung von Kolonkarzinom-Zelllinien

Um erste Anhaltspunkte für die Funktionen von ATOH8 in der kolorektalen Karzinogenese zu erhalten, wurde ein Koloniebildungsassay durchgeführt. Hierfür wurde ATOH8 in drei verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien transient überexprimiert und der Effekt der Überexpression auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden betrachtet (Abb. 4.24).



**Abbildung 4.24** Koloniebildungsassay in drei Kolonkarzinom-Zelllinien

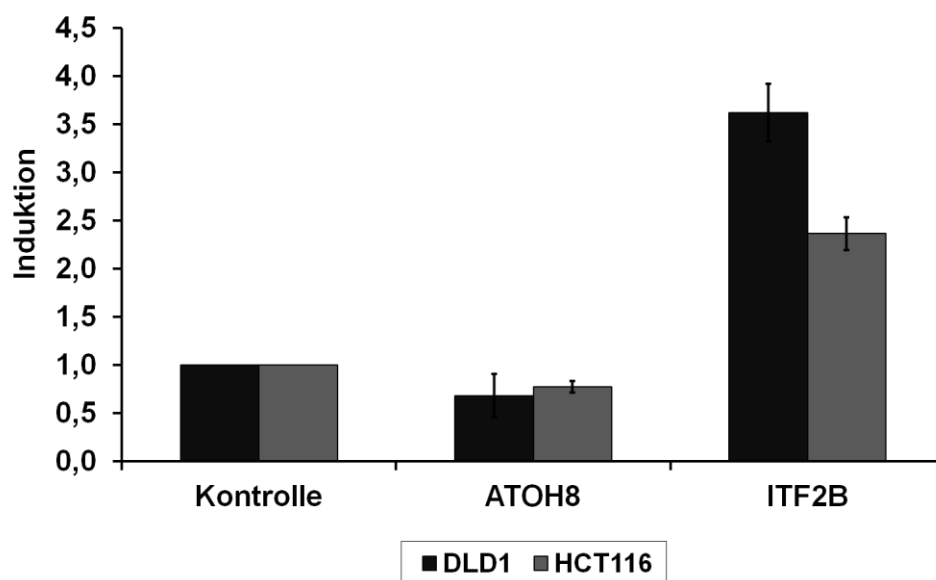
Ein konstitutiv aktives Expressionskonstrukt für ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) wurde in drei verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien transient transfiziert. Die Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Leervektor (pcDNA3) transfiziert. Eine definierte Anzahl der Zellen wurde in 10cm Schalen ausgesät und für 3 Wochen in G418-Sulfat-haltigem Selektionsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Färbung der Kolonien und die statistische Auswertung. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.



Verglichen mit den Kontrollzellen führte die Überexpression von ATOH8 in allen drei Kolonkarzinom-Zelllinien zu einer massiven Reduktion der Kolonieanzahl auf Werte von 4% bis 8%.

#### 4.4.2 ATOH8 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup>

Um zu überprüfen, ob der im Koloniebildungsassay gesehene Effekt von ATOH8 auf das Wachstum von Kolonkarzinom-Zelllinien, wie bereits für ITF-2B gezeigt (Herbst et al., 2009a), p21<sup>Cip1</sup> vermittelt ist, wurden Reporterassays in DLD1 und HCT116 Zellen durchgeführt. Als Reporterassay wurde pGL3-Basic/Cip1 K (Herbst et al., 2009a) verwendet und seine Aktivierung durch ITF-2B und ATOH8 überprüft (Abb. 4.25). Während die bereits publizierte Induktion von p21<sup>Cip1</sup> durch ITF-2B reproduziert werden konnte, war kein vergleichbarer Effekt von ATOH8 auf p21<sup>Cip1</sup> zu beobachten.

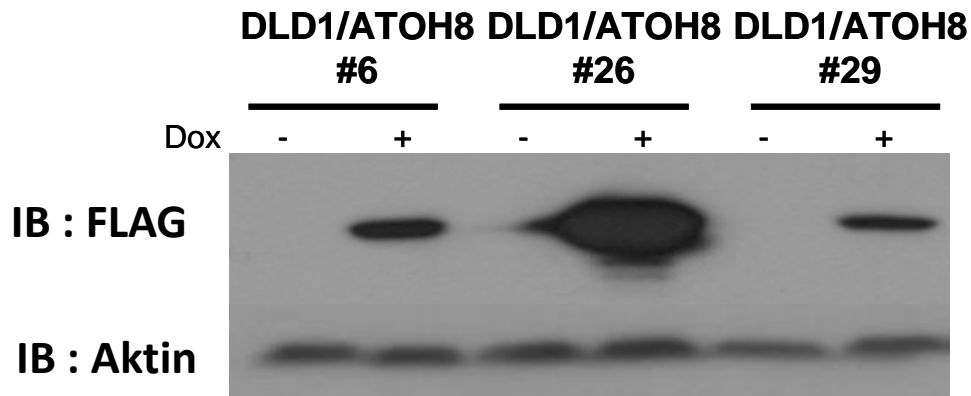


**Abbildung 4.25 Induktion der Expression von p21<sup>Cip1</sup> durch ATOH8**

Das Reporterassaykonstrukt pGL3-Basic/Cip1 K (Herbst et al., 2009a) wurde in DLD1- und HCT116-Zellen mit konstitutiv aktiven Expressionskonstrukten für ITF-2B (pcDNA3/ITF2B-HA) und ATOH8 (pcDNA3/ATOH8-3xFLAG) bzw. mit einem Leervektor (Kontrolle) einzeln und in Kombination transient transfiziert und 48h inkubiert. Die gemessenen Luziferasewerte wurden auf  $\beta$ -Galactosidase normalisiert und auf die normalisierten Luziferasewerte der Kontrolle bezogen. Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

#### 4.4.3 Die Expression von ATOH8 hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus

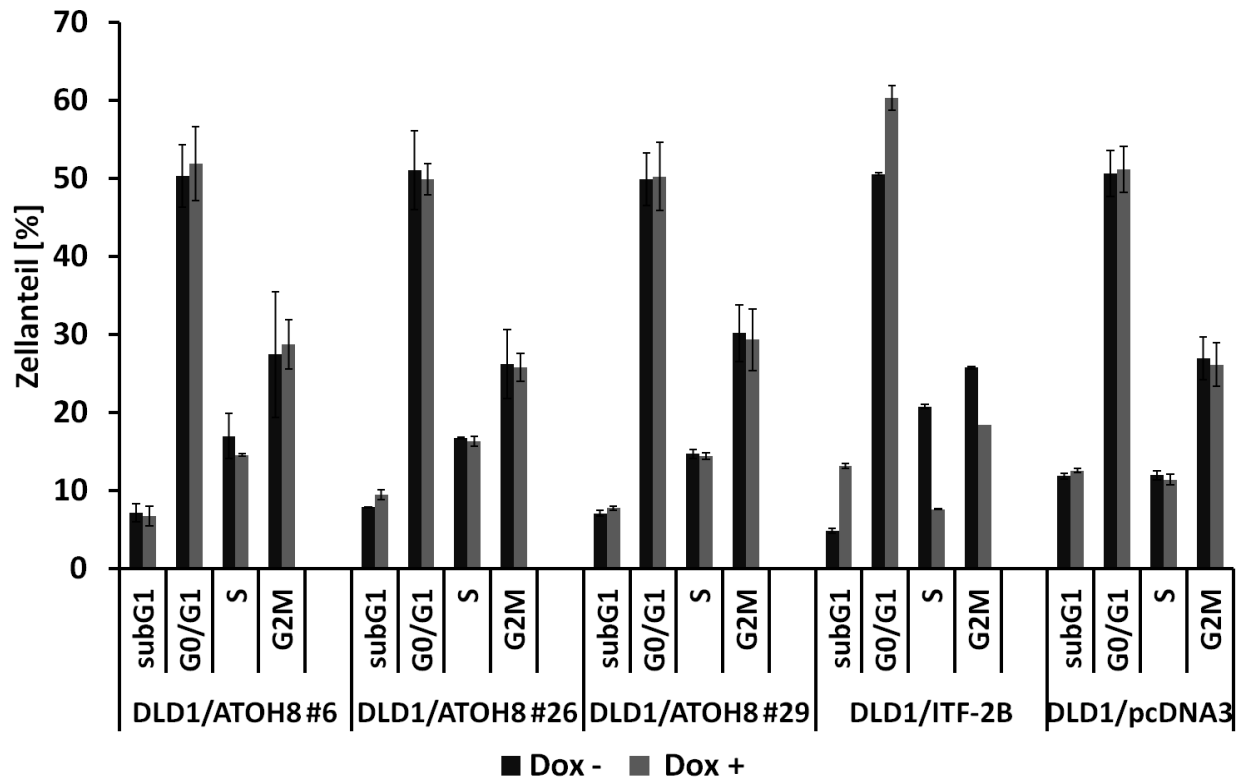
Um den Einfluss von ATOH8 auf den Zellzyklus von Kolonkarzinom-Zelllinien zu überprüfen, wurde eine stabile Zelllinie generiert, die ATOH8 Doxycyclin abhängig exprimiert (Abb. 4.26).



**Abbildung 4.26** ATOH8 Expression in DLD1/ATOH8-3xFLAG Zellen nach Doxycyclin-Stimulation

DLD1/ATOH8-3xFLAG Zellen (Klone 6, 26 und 29) wurden 24h mit Doxycyclin stimuliert bzw. nicht stimuliert und die Expression des ATOH8 Proteins im Western Blot untersucht. Die Abbildung ist repräsentativ, das Ergebnis wurde durch mehrere unabhängige Experimente reproduziert.

Die durchgeführten Zellzyklusanalysen zeigten keinen Effekt von ATOH8 auf den Zellzyklus, der die im Koloniebildungsassay beobachtete Inhibition des Wachstums von Kolonkarzinom-Zelllinien durch ATOH8 erklären würde (Abb. 4.27).



**Abbildung 4.27 Zellzyklusverteilung von DLD1/ATOH8-3xFLAG Zellen**

DLD1/ATOH8-3xFLAG Zellen (Klone 6, 26, 29 und ein Leerklon) wurden 12h nach Aussaat mit Doxycyclin stimuliert. Nach 24h wurde das Vollmedium mit serumfreiem Medium ersetzt und die Zellen 48h in Hungermedium gehalten um einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Anschließend wurde der Zellzyklus durch Vollmedium wieder angetrieben und die Zellen nach 16h geerntet, nach Nicoletti angefärbt und im Durchflusszytometer auf ihre Verteilung im Zellzyklus hin untersucht. DLD1/ITF-2B Zellen wurden als Positivkontrolle und DLD1/pcDNA3 Zellen als Negativkontrolle mitgeführt, Standardabweichungen und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

## 5 Diskussion

Der Verlust des Chromosomenabschnitts 18q21 durch LOH kann in der Mehrzahl aller kolorektalen Karzinome beobachtet werden (Pino & Chung, 2010). Er erfolgt zumeist am Übergang vom späten Adenom zum invasiven Karzinom und scheint die Tumورprogression zu fördern (Vogelstein et al., 1989; Vogelstein & Kinzler, 2002). Es gilt als bewiesen, dass der Verlust des Chromosomenabschnitts 18q21 ein prognostisch ungünstiger Faktor ist, allerdings ist bis heute unklar, welcher Tumorsuppressor auf 18q21 dafür verantwortlich gemacht werden muss (Kikuchi-Yanoshita et al., 1992; Thiagalingam et al., 1996; Mehlen & Fearon, 2004; Popat & Houlston, 2005; Castets et al., 2012). Eines der Gene, die auf 18q21 liegen, kodiert für den bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2. ITF-2 ist ein  $\beta$ -Catenin Zielgen (Kolligs et al., 2002b), dessen Splicevariante ITF-2B in der Lage ist, in Kolonkarzinom-Zelllinien über eine p53-unabhängige Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup> einen Zellzyklusarrest zu induzieren und Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren (Herbst et al., 2009a). ITF-2B könnte daher ein neues Tumorsuppressorgen der kolorektalen Karzinogenese sein, dessen Verlust maßgeblich die Progression von späten Adenomen zu Karzinomen beeinflusst. Allerdings wurde von Mologni et al. beschrieben, dass das Wachstum von kolorektalen Tumoren signifikant reduziert werden konnte durch eine simultane Herunterregulierung von ITF-2 und  $\beta$ -Catenin (Mologni et al., 2010). Es bleibt daher zu klären, ob ITF-2 eher als Tumorsuppressor oder als Onkogen fungiert.

### 5.1 Zielgene des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF-2B

ITF-2 spielt als Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten (Corneliussen et al., 1991; Murre, 2005; Cisse et al., 2008;), Brustepithelzellen (Parrinello et al., 2001), Melanozyten (Furumura et al., 2001) und neuronalem Gewebe (Persson et al., 2000). Um die Bedeutung von ITF-2B in der kolorektalen Karzinogenese näher zu charakterisieren, haben wir uns auf die Suche nach Zielgenen von ITF-2B gemacht, die ähnlich dem Zellzyklusinhibitor p21<sup>Cip1</sup> eine potentielle Tumorsuppressorfunktion vermitteln könnten. Insgesamt wurden im durchgeführten DNA-Mikroarray 42 Gene identifiziert, die in ihrer Expression mindestens zweifach durch ITF-2B induziert werden. Die Heterogenität dieser Gene und ihrer Genprodukte lässt vermuten, dass ITF-2B an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei ITF-2B um einen Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktor handelt, ist davon auszugehen, dass ITF-2B einen Großteil seiner regulatorischen Aufgaben nicht alleine bewerkstelligt, sondern Homo- oder Heterodimere mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren bildet. ATOH8 wurde unter allen ITF-2B Zielgenen für weitere Analysen ausgewählt, da wir

eine ITF-2B abhängige Induktion seiner Expression reproduzierbar in zwei verschiedenen Zelllinien zeigen konnten und da ATOH8 funktionell interessant erschien. Die Tatsache, dass die untersuchten Zielgene durch ITF-2A in ihrer Expression nur mäßig induziert wurden, überrascht nicht, da ITF-2A aufgrund der fehlenden Aktivierungsdomäne AD1 ein sehr viel schwächeres transkriptionelles Aktivierungspotential aufweist als ITF-2B (Herbst & Kolligs, 2008). Bei ATOH8 handelt es sich um einen bisher nur wenig untersuchten Transkriptionsfaktor der Klasse II. Bisherige Untersuchungen zu ATOH8 beziehen sich häufig auf sein Maus Ortholog *Mouse Atonal Homolog 6* (MATH6). Allerdings weisen sowohl die bHLH-Domäne als auch die Promotorsequenzen von ATOH8 und MATH6 eine große Homologie auf (Chen et al., 2011), so dass Ergebnisse für MATH6 auf ATOH8 übertragbar scheinen. Für MATH6 wird eine wichtige Rolle in frühen Entwicklungsstadien angenommen, da MATH6<sup>-/-</sup> Mäuse bereits früh in der Embryogenese versterben (Lynn et al., 2008). Desweiteren wird MATH6 eine Rolle in der Entwicklung von neuronalem Gewebe (Inoue et al., 2001), bei der renalen Podozytenentwicklung (Ross et al., 2006) und der Pankreasentwicklung (Lynn et al., 2008) zugeschrieben, während ATOH8 in der Entwicklung von Retina und Skelettmuskel im Zebrafisch (Yao et al., 2010) Bedeutung zu haben scheint. In Bezug auf kanzerogene Prozesse wurden Veränderungen in ATOH8 Expressionsmustern bei Patienten mit Oligodendrogliomen (Ducray et al., 2008) und Glioblastomen (Freire et al., 2008) beschrieben. Wir konnten erstmalig zeigen, dass ATOH8 in adultem Darmgewebe exprimiert wird und seine Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien durch ITF-2B reguliert wird.

## 5.2 Charakterisierung des ATOH8 Promotors

bHLH-Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA Sequenzen, den so genannten Ephrussi (E)-Boxen. E-Boxen werden in regulatorischen Bereichen von Genen, wie Promotor- und Enhancerregionen, gefunden und besitzen die Consensus-Sequenz (G/A)CANNTG(G/A) (Ephrussi et al., 1985; Voronova & Baltimore, 1990; Murre, 2005). Kürzlich wurde ein Element mit regulatorischer Funktion innerhalb der 5' UTR direkt *upstream* des Start-ATGs des MATH6 Gens beschrieben (Pujadas et al., 2011; Chen et al., 2011). Von den in dieser Arbeit untersuchten Promotorfragmenten umfasste das Konstrukt „ATOH8 562nt“ genau dieses regulatorische Element und beinhaltete letztendlich auch die gesuchte E-Box, über die die Aktivierung des ATOH8 Promotors stattfindet. Damit decken sich unsere Ergebnisse bei der Charakterisierung des ATOH8 Promotors mit den Beobachtungen von Chen et al. und Pujadas et al. in Bezug auf die Lokalisation regulativer Bereiche im MATH6 Promotor.

### 5.2.1 ITF-2B benötigt NeuroG3 als Interaktionspartner

Lynn et al. beschrieben 2008, dass MATH6 ein Zielgen des Klasse II bHLH-Transkriptionsfaktors NeuroG3 ist. Da wir in unseren Reporterassays für keines der untersuchten Promotorfragmente eine Aktivierung durch ITF-2B alleine oberhalb des a priori festgelegten Schwellenwerts von 2,5 nachweisen konnten, entstand die Theorie, dass ITF-2B NeuroG3 als Interaktionspartner benötigt, um an den ATOH8 Promotor zu binden. Die Theorie wurde gestützt durch die Tatsache, dass es sich bei ITF-2B um einen Klasse I und bei NeuroG3 um einen Klasse II bHLH-Transkriptionsfaktor handelt, da Klasse I und II bHLH-Transkriptionsfaktoren sehr häufig Heterodimere bilden (Murre et al., 1994). Desweiteren ist von anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren aus der Entwicklung verschiedener Gewebearten bekannt, dass sie gerne Netzwerke untereinander ausbilden und sich gegenseitig regulieren (Persson et al., 2000; Bhattacharya & Baker, 2011). NeuroG3 hat eine wichtige Rolle bei der Entstehung des endokrinen Pankreas und der Entwicklung des neuroendokrinen Systems (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002; Lee et al., 2002). NeuroG3 reguliert als Transkriptionsfaktor neben der Expression von MATH6 die Expression von *neurogenic differentiation 1* (NeuroD1), *paired box gene 4* (Pax4), *NK2 homeobox 2* (Nkx2-2) und *insulinoma associated 1* (IA-1) (Huang et al., 2000; Smith et al., 2003; Watada et al., 2003; Mellitzer et al., 2006). Wir konnten mittels CoIP erstmals eine physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3 nachweisen und darüber hinaus zeigen, dass ITF-2B und NeuroG3 einen synergistischen Effekt bei der Aktivierung des ATOH8 Promotors aufweisen. Allerdings konnte dieser synergistische Effekt nur mit relativ kurzen Promotorfragmenten gezeigt werden. Das könnte bedingt sein durch die Tatsache, dass längere Promotorfragmente mehr E-Boxen und damit mehr potentielle Bindungsstellen für das ITF-2B/NeuroG3 Heterodimer beinhalten und somit die Bindung an die richtige E-Box gestört wird. Eine weitere Erklärung wäre der Einfluss anderer aktivierender oder inhibierender Transkriptionsfaktoren in den untersuchten Zellen, die an den ATOH8 Promotor binden und so die Aktivierung des Promotors durch ITF-2B und NeuroG3 beeinflussen. Je länger die Promotorfragmente sind, umso mehr potentielle Bindungsstellen stehen für eine solche Fremdbeeinflussung des Promotors zur Verfügung.

### 5.2.2 Identifikation von Bindungsstellen des ITF-2B/NeuroG3-Heterodimers am ATOH8 Promotor

Die E-Box A, die wir als Bindungsstelle für das ITF-2B/NeuroG3 Heterodimer am ATOH8 Promotor identifizieren konnten, liegt innerhalb des oben beschriebenen regulativen Bereichs und wurde bereits von Pujadas et al. als Bindungsstelle von NeuroG3 am MATH6 Promotor beschrieben (Pujadas et al., 2011). Es ist daher als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass die

DNA Bindung des Heterodimers aus ITF-2B und NeuroG3 am ATOH8 Promotor vornehmlich NeuroG3 vermittelt ist, obwohl wir mittels ChIP auch eine physikalische Interaktion von ITF-2B mit dieser Promotorregion nachweisen konnten. Sowohl die funktionelle Regulation von MATH6 durch NeuroG3, als auch die physikalische Interaktion von NeuroG3 mit dem MATH6 Promotor wurden bereits mehrfach gezeigt (Lynn et al., 2008; Pujadas et al., 2011) und können aufgrund der Homologie der Orthologe auch für ATOH8 angenommen werden. Wir waren in der Lage zu beweisen, dass eine Kombination der Transkriptionsfaktoren NeuroG3 und ITF-2B die Aktivierung des ATOH8 Promotors signifikant verstärkt. Die Bedeutung von ITF-2B in diesem Zusammenhang bleibt allerdings unklar. Die Frage, die sich stellt ist, ob ITF-2B tatsächlich maßgeblich an der Regulation der Expression von ATOH8 beteiligt ist oder lediglich eine Verstärkerrolle bei der regulatorischen Funktion von NeuroG3 auf ATOH8 hat. Interessant ist dabei, dass ATOH8 außer durch NeuroG3 auch noch durch eine Vielzahl anderer bHLH Transkriptionsfaktoren reguliert zu werden scheint (Lynn et al., 2008). Auch hier könnte ITF-2B verstärkende Effekte haben. ATOH8 ist zwar aufgrund der Mikroarray Ergebnisse und der Verifizierung dieser mittels qRT-PCR eindeutig als Zielgen von ITF-2B anzusehen, jedoch war ITF-2B allein in keinem der durchgeführten Reporterassays in der Lage den Promotor von ATOH8 erwartungsgemäß stark zu aktivieren. Die stärkste Aktivierung des ATOH8 Promotors durch ITF-2B alleine konnte für das längste der Promotorkonstrukte „ATOH8 2227nt“ nachgewiesen werden. Es kann also vermutet werden, dass ITF-2B auch alleine durchaus in der Lage ist den ATOH8 Promotor zu aktivieren, die hierfür notwendigen E-Boxen aber nicht im in dieser Arbeit charakterisierten Promotorbereich direkt oberhalb des Start-ATGs liegen.

### 5.3 Interaktion von ITF-2B mit seinem Zielgen ATOH8

bHLH-Proteine bilden gerne Netzwerke aus, in denen sie sich gegenseitig regulieren (Persson et al., 2000; Bhattacharya & Baker, 2011). Um zu überprüfen, ob ITF-2B, NeuroG3 und ATOH8 Teil eines solchen bHLH-Protein Netzwerkes sind, haben wir untersucht, ob ITF-2B mit seinem eigenen Zielgen ATOH8 interagiert und ob ATOH8 in einer Art *Feedback* Mechanismus in der Lage ist die transkriptionelle Aktivität von ITF-2B zu beeinflussen. Eine solche *Feedback* Rolle von ATOH8 auf NeuroG3 wurde von Lynn et al. bereits in der Entwicklung und Differenzierung des endokrinen Pankreas vorgeschlagen (Lynn et al., 2008). Desweiteren sind solche autoregulativen *Feedback-Loops* bereits für die bHLH-Proteine *acheate*, *scute* und *atonal* bei der Entwicklung der sensorischen Organe der *Drosophila* beschrieben worden (Zur Lage et al., 2004), außerdem für *neurogenic differentiation* (NeuroD) bei der neuronalen Entwicklung (Farah et al., 2000) und für *myogenic differentiation antigen* (myoD) bei der Myogenese (Thayer & Weintraub, 1990). Wir

konnten zeigen, dass ITF-2B und ATOH8 auf Proteinebene interagieren. Bei funktionellen Untersuchungen mittels Reporterassays scheint ATOH8 sowohl auf die transkriptionelle Aktivität von ITF-2B, als auch auf die transkriptionelle Aktivität von NeuroG3 einen inhibierenden Effekt zu haben. Es kann also vermutet werden, dass ATOH8 in einem negativen *Feedback-Loop* seine eigene Expression beeinflusst und dass ATOH8, ITF-2B und NeuroG3 tatsächlich eine Art Netzwerk aus bHLH-Proteinen bilden. Interessanterweise waren Lynn et al. in der Lage zu zeigen, dass ATOH8 die transkriptionelle Aktivität von NeuroG3 nicht universell inhibiert, sondern nur bei bestimmten NeuroG3 Zielgenen (Lynn et al., 2008). Bisher ist unklar, wie diese scheinbare Selektivität zustande kommt, desweiteren muss der genaue Mechanismus, mit welchem ATOH8 an die Promotoren der entsprechenden Zielgene rekrutiert wird, geklärt werden.

## 5.4 Untersuchung der Funktion von ATOH8

Wir konnten zeigen, dass die Überexpression von ATOH8 in Kolonkarzinom-Zelllinien die Koloniebildung dieser Zellen signifikant reduziert. Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, bleibt bisher allerdings unklar. Weder induziert ATOH8 wie ITF-2B die Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup>, noch konnten wir Effekte von ATOH8 auf den Zellzyklus oder die Apoptoserate zeigen. Bisher unveröffentlichte Beobachtungen bei der Durchführung von Proliferationsassays lassen vermuten, dass die Expression von ATOH8 auch hier keine signifikante Veränderung in den Wachstumsraten der Zellen hervorruft. Aufgrund seiner Funktion als Differenzierungsfaktor wäre zu erwarten gewesen, dass ATOH8 Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, da das eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung von Differenzierungsprozessen darstellt (Funato et al., 2001). Zur letztendlichen Klärung der Funktion von ATOH8 und der zellulären Mechanismen, denen sich ATOH8 bedient, sind weitere Untersuchungen nötig. Auch *in vivo* Studien könnten helfen, die Bedeutung von ATOH8 weiter aufzuklären, allerdings müssten diese in konditionalen *knock-out* Tieren durchgeführt werden, da wie oben beschrieben MATH6<sup>-/-</sup> Mäuse nicht lebensfähig sind.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass ATOH8 ein Zielgen des bHLH Transkriptionsfaktors ITF-2B ist und dass ITF-2B und NeuroG3 interagieren, wenn sie den Promotor ihres gemeinsamen Zielgenes ATOH8 aktivieren. Wir haben die Bindungsstelle für das ITF-2B/NeuroG3 Heterodimer am ATOH8 Promotor identifiziert und unsere Ergebnisse zum ATOH8 Promotor decken sich mit den bisher veröffentlichten Erkenntnissen zum MATH6 Promotor. Darüber hinaus waren wir in der Lage eine Interaktion von ITF-2B mit seinem Zielgen ATOH8 per CoIP nachzuweisen und wir konnten weitere Hinweise darauf sammeln, dass ATOH8 in einem negativen *Feedback-Loop* in der Lage ist die



transkriptionelle Aktivität der ihn regulierenden bHLH-Proteine zu reduzieren. Desweiteren haben wir gezeigt, dass ATOH8 die Koloniebildungsfähigkeit von Kolonkarzinom-Zelllinien drastisch vermindert, die dafür verantwortlichen Mechanismen konnten allerdings bisher nicht geklärt werden. Zukünftige Untersuchungen sollten durch Identifikation und Charakterisierung von ATOH8 Zielgenen versuchen, die Funktion dieses Transkriptionsfaktors besser zu verstehen. Hierfür ist sicher auch die Etablierung eines oben bereits erwähnten konditionalen *knock-out*-Modells für ATOH8 sinnvoll. Desweiteren sollte die interessante Beobachtung, dass ATOH8 seine eigene Expression über *Feedback* Mechanismen zu modulieren scheint, weiter untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei darauf gelegt werden, wie und wo ATOH8 an seinen eigenen Promotor bindet bzw. wie ATOH8 die transkriptionelle Aktivität der ihn regulierenden Proteine inhibiert. Die ursprüngliche Frage, ob es sich bei ITF-2B tatsächlich um einen neuen Tumorsuppressorkandidaten auf 18q21 handelt und ob ATOH8 einen Teil dieser Tumorsuppressorfunktion vermittelt, konnte in dieser Arbeit nur unzureichend beantwortet werden. ATOH8 inhibiert als ITF-2B Zielgen das Wachstum von Kolonkarzinom-Zelllinien, sodass bei einem Verlust von ITF-2B aufgrund von LOH des Chromosomenabschnitts 18q21 und einer konsekutiv verminderten Expression von ATOH8 ein Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen angenommen werden kann. Es scheint allerdings als wäre ITF-2B bei der Regulation der Expression von ATOH8 lediglich ein Faktor unter mehreren, dessen Bedeutung bisher nicht vollkommen klar ist. Zum momentanen Zeitpunkt können wir also nicht davon ausgehen, dass ATOH8, trotz seines massiven Einflusses auf das Wachstum von Kolonkarzinom-Zelllinien, als Vermittler einer potentiellen Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B angesehen werden kann.

## 6 Zusammenfassung

In einem Großteil aller kolorektalen Karzinome geht am Übergang vom späten Adenom zum invasiven Karzinom der Chromosomenabschnitt 18q21 durch *Loss of Heterozygosity* (LOH) verloren. Es ist bekannt, dass der Verlust dieses Chromosomenabschnitts die Prognose betroffener Patienten signifikant verschlechtert, allerdings ist bis heute unklar, welches der Gene, die auf 18q21 liegen, dafür verantwortlich ist. Eines der Gene auf 18q21 kodiert für das Klasse I *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) Protein Immunglobulin-Transkriptionsfaktor 2 (ITF-2). ITF-2B, eine Splicevariante von ITF-2, ist in der Lage in Kolonkarzinom-Zelllinien über eine p53-unabhängige Induktion der Expression des Zellzyklusinhibitors p21<sup>Cip1</sup> einen Zellzyklusarrest zu induzieren und Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose zu sensitivieren. Um diese potentielle Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B näher zu untersuchen, war es Aufgabe dieser Arbeit Zielgene von ITF-2B zu identifizieren und auf eine mögliche Vermittlung der Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B hin zu untersuchen. Mittels DNA-Mikroarray wurden 42 Gene identifiziert, die in ihrer Expression mindestens zweifach durch ITF-2B induziert werden. Anhand einer Literaturrecherche wurden funktionell interessant erscheinende Kandidaten ausgewählt und die Mikroarray Ergebnisse für diese Kandidaten mittels quantitativer *Real Time* PCR (qRT-PCR) validiert. Als vielversprechendster Kandidat wurde das Klasse II bHLH-Protein *Atonal Homolog 8* (ATOH8) für weitere Analysen ausgewählt. Bei der Untersuchung der transkriptionellen Regulation des ATOH8 Gens durch ITF-2B kamen wir zu der Erkenntnis, dass ITF-2B Neurogenin 3 (NeuroG3) als Heterodimerisierungspartner zur Aktivierung des ATOH8 Promotors benötigt. Mittels Co-Immunopräzipitation konnten wir eine physikalische Interaktion von ITF-2B und NeuroG3 nachweisen und anhand von Reporterassays waren wir in der Lage zu zeigen, dass ITF-2B und NeuroG3 einen funktionellen Synergismus bei der Aktivierung des ATOH8 Promotors aufweisen. Bei der weiteren Charakterisierung des ATOH8 Promotors gelang es uns, die exakte Bindungsstelle des ITF-2B/NeuroG3 Heterodimers zu lokalisieren. Darüber hinaus zeigen wir in dieser Arbeit, dass ATOH8 nicht nur ein Zielgen von ITF-2B ist, sondern auch, dass die beiden bHLH-Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene interagieren. Funktionell ergeben sich Hinweise, dass ATOH8 die transkriptionelle Aktivität von ITF-2B und NeuroG3 in einer Art negativen *Feedback-Loop* zu reduzieren scheint. Wir zeigen, dass ATOH8 in der Lage ist die Koloniebildungsfähigkeit von Kolonkarzinom-Zelllinien drastisch zu reduzieren, allerdings konnte der Mechanismus, der dieser Beobachtung zu Grunde liegt bisher nicht geklärt werden. Insgesamt konnte nicht abschließend geklärt werden, ob ATOH8, trotz seiner Fähigkeit das Wachstum von Kolonkarzinom-Zellen signifikant zu vermindern, als Vermittler einer potentiellen Tumorsuppressorfunktion von ITF-2B angesehen werden kann.

---

Zur definitiven Klärung des Tumorsuppressorgenstatus von ITF-2B wird die Etablierung eines genetischen Tiermodells notwendig sein.

## 7 Literaturverzeichnis

Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S., & Kageyama, R. (1995). A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 270, 8730–8738.

Alexander, K., & Flasnoecker, M. (1999). *Thiemes innere Medizin: TIM ; 848 Tabellen*. Stuttgart: Thieme.

Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe Angelis, M. de, Lendahl, U., & Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*, 400, 877–881.

Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., & Walker, M. D. (1993). The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8063–8067.

Atchley, W. R., & Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5172–5176.

Ayer, D. E., Kretzner, L., & Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell*, 72, 211–222.

Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., & Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61, 49–59.

Bertrand, N., Castro, D. S., & Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews. Neuroscience*, 3, 517–530.

Bertz, J. (2010). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI*. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert-Koch-Inst.

Bhattacharya, A., & Baker, N. E. (2011). A network of broadly expressed HLH genes regulates tissue-specific cell fates. *Cell*, 147, 881–892.

Bienz, M., & Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103, 311–320.

Blackwood, E. M., & Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science (New York, N.Y.)*, 251, 1211–1217.

Boland, C. R., & Goel, A. (2005). Somatic evolution of cancer cells. *Seminars in cancer biology*, 15, 436–450.

Boland, C. R., Shin, S. K., & Goel, A. (2009). Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer. *Yonsei medical journal*, 50, 309–321.

Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.-M., Laux, G., Bachl, J., Korndorfer, M., Schlee, M., Hölzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., & Feuillard, J. (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic acids research*, 33, e137.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.

Bruns, C., & Auernhammer, C. (2010). *Gastrointestinale Tumoren: [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]*. (8. Aufl.). Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. München: Zuckschwerdt.

Budanov, A. V., Shoshani, T., Faerman, A., Zelin, E., Kamer, I., Kalinski, H., Gorodin, S., Fishman, A., Chajut, A., Einat, P., Skalter, R., Gudkov, A. V., Chumakov, P. M., & Feinstein, E. (2002). Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability. *Oncogene*, 21, 6017–6031.

Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.-Y., Bernet, A., & Mehlen, P. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature*, *482*, 534–537.

Chan, A. T., & Giovannucci, E. L. (2010). Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, *138*, 2029-2043.e10.

Chen, J., Dai, F., Balakrishnan-Renuka, A., Leese, F., Schempp, W., Schaller, F., Hoffmann, M. M., Morosan-Puopolo, G., Yusuf, F., Bisschoff, I. J., Chankiewicz, V., Xue, J., Chen, J., Ying, K., & Brand-Saberi, B. (2011). Diversification and molecular evolution of ATOH8, a gene encoding a bHLH transcription factor. *PloS one*, *6*, e23005.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, *162*, 156–159.

Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., Holter, W., Rauch, A., Zhuang, Y., & Reizis, B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*, *135*, 37–48.

Clevers, H. (2004). Wnt breakers in colon cancer. *Cancer cell*, *5*, 5–6.

Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, *151*, 369–374.

Corneliussen, B., Thornell, A., Hallberg, B., & Grundström, T. (1991). Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *Journal of virology*, *65*, 6084–6093.

Davis, R. L., & Turner, D. L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene*, *20*, 8342–8357.

Ducray, F., Idbaih, A., Reyniès, A. de, Bièche, I., Thillet, J., Mokhtari, K., Lair, S., Marie, Y., Paris, S., Vidaud, M., Hoang-Xuan, K., Delattre, O., Delattre, J.-Y., & Sanson, M. (2008).

Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Molecular cancer*, 7, 41.

Dukes C. (1932). The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 323–332.

Eickbush, T. H., & Moudrianakis, E. N. (1978). The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell*, 13, 295–306.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., & Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes & development*, 8, 970–980.

Ellis, H. M., Spann, D. R., & Posakony, J. W. (1990). extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in Drosophila, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell*, 61, 27–38.

Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S., & Gilbert, W. (1985). B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 227, 134–140.

Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, 421, 753–756.

Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., & Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development (Cambridge, England)*, 127, 693–702.

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759–767.

Ferlay J, S. H. B. F. F. D. M. C. a. P. D. (2010a). GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=276>. Accessed 01.07.2012.

Ferlay J, S. H. B. F. F. D. M. C. a. P. D. (2010b). GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency

for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>. Accessed 01.07.2012.

Ferré-D'Amaré, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B., & Burley, S. K. (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature*, 363, 38–45.

Freire, P., Vilela, M., Deus, H., Kim, Y.-W., Koul, D., Colman, H., Aldape, K. D., Bogler, O., Yung, W. K. A., Coombes, K., Mills, G. B., Vasconcelos, A. T., & Almeida, J. S. (2008). Exploratory analysis of the copy number alterations in glioblastoma multiforme. *PloS one*, 3, e4076.

Funato, N., Ohtani, K., Ohyama, K., Kuroda, T., & Nakamura, M. (2001). Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Molecular and cellular biology*, 21, 7416–7428.

Furumura, M., Potterf, S. B., Toyofuku, K., Matsunaga, J., Muller, J., & Hearing, V. J. (2001). Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *The Journal of biological chemistry*, 276, 28147–28154.

Garrell, J., & Modolell, J. (1990). The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell*, 61, 39–48.

Gershoni, J. M., & Palade, G. E. (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Analytical biochemistry*, 124, 396–405.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., & Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 1607–1611.

Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., & Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human genetics*, 83, 155–158.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 519–561.



Gumbiner, B. M. (1995). Signal transduction of beta-catenin. *Current opinion in cell biology*, 7, 634–640.

Haberland, J., Bertz, J., Wolf, U., Ziese, T., & Kurth, B.-M. (2010). German cancer statistics 2004. *BMC cancer*, 10, 52.

Henthorn, P., Kiledjian, M., & Kadesch, T. (1990). Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer microE5/kappa 2 motif. *Science (New York, N.Y.)*, 247, 467–470.

Herbst, A., & Kolligs, F. T. (2008). A conserved domain in the transcription factor ITF-2B attenuates its activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 370, 327–331.

Herbst, A., Bommer, G. T., Kriegl, L., Jung, A., Behrens, A., Csanadi, E., Gerhard, M., Bolz, C., Riesenberger, R., Zimmermann, W., Dietmaier, W., Wolf, I., Brabletz, T., Göke, B., & Kolligs, F. T. (2009a). ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology*, 137, 639-48, 648.e1-9.

Herbst, A., Helferich, S., Behrens, A., Göke, B., & Kolligs, F. T. (2009b). The transcription factor ITF-2A induces cell cycle arrest via p21(Cip1). *Biochemical and biophysical research communications*, 387, 736–740.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 10, 413–417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 11, 1026–1030.

Higuchi, T., Orita, T., Katsuya, K., Yamasaki, Y., Akiyama, K., Li, H., Yamamoto, T., Saito, Y., & Nakamura, M. (2004). MUC20 suppresses the hepatocyte growth factor-induced Grb2-Ras pathway by binding to a multifunctional docking site of met. *Molecular and cellular biology*, 24, 7456–7468.

Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M., & Tsai, M. J. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Molecular and cellular biology*, 20, 3292–3307.

Husmann, G. (2010). *Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (7. Ausg.)*. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Saarbrücken: Robert Koch-Inst; GEKID.

Inoue, C., Bae, S. K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y., & Kageyama, R. (2001). Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes to cells devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6, 977–986.

Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., & Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363, 558–561.

Issa, J.P. (2008). Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14, 5939–5940.

Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2044–2058.

Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Keding, M., & Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO journal*, 21, 6338–6347.

Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*, 271, 17771–17778.

Kageyama, R., & Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current opinion in genetics & development*, 7, 659–665.

Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K., & Näthke, I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature cell biology*, 3, 429–432.

Katoh, Y., & Katoh, M. (2006). Canonical WNT signaling pathway and human AREG. *International journal of molecular medicine*, 17, 1163–1166.

Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., & Akiyama, T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 289, 1194–1197.

Kikuchi-Yanoshita, R., Konishi, M., Fukunari, H., Tanaka, K., & Miyaki, M. (1992). Loss of expression of the DCC gene during progression of colorectal carcinomas in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer research*, 52, 3801–3803.

Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159–170.

Kolligs, F. T., Bommer, G., & Göke, B. (2002a). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66, 131–144.

Kolligs, F. T., Nieman, M. T., Winer, I., Hu, G., van Mater, D., Feng, Y., Smith, I. M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K. R., & Fearon, E. R. (2002b). ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer cell*, 1, 145–155.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lee, C. S., Perreault, N., Brestelli, J. E., & Kaestner, K. H. (2002). Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes & development*, 16, 1488–1497.

Leggett, B., & Whitehall, V. (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 138, 2088–2100.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643–649.

- Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., & Davis, M. M. (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science (New York, N.Y.)*, 243, 217–220.
- Lynn, F. C., Sanchez, L., Gomis, R., German, M. S., & Gasa, R. (2008). Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network. *PLoS one*, 3, e2430.
- Ma, P. C., Rould, M. A., Weintraub, H., & Pabo, C. O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77, 451–459.
- Ma, Q., Kintner, C., & Anderson, D. J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell*, 87, 43–52.
- Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and cellular biology*, 20, 429–440.
- Massari, M. E., Jennings, P. A., & Murre, C. (1996). The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 16, 121–129.
- Mehlen, P., & Fearon, E. R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22, 3420–3428.
- Mellitzer, G., Bonné, S., Luco, R. F., van de Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D., Nielsen, F. C., Ferrer, J., Gradwohl, G., & Heimberg, H. (2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *The EMBO journal*, 25, 1344–1352.
- Mologni, L., Dekhil, H., Ceccon, M., Purgante, S., Lan, C., Cleris, L., Magistroni, V., Formelli, F., & Gambacorti-Passerini, C. B. (2010). Colorectal tumors are effectively eradicated by combined inhibition of  $\beta$ -catenin, KRAS, and the oncogenic transcription factor ITF2. *Cancer research*, 70, 7253–7263.

- Murre, C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nature immunology*, 6, 1079–1086.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., & Stuver, M. H. (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1218, 129–135.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., & Lassar, A. B. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537–544.
- Muto, T., Bussey, H. J., & Morson, B. C. (1975). The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36, 2251–2270.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 139, 271–279.
- Ogino, S., & Goel, A. (2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of molecular diagnostics JMD*, 10, 13–27.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55, 74–108.
- Parrinello, S., Lin, C. Q., Murata, K., Itahana, Y., Singh, J., Krtolica, A., Campisi, J., & Desprez, P. Y. (2001). Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276, 39213–39219.
- Peifer, M. (1993). Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science (New York, N.Y.)*, 262, 1667–1668.
- Persson, P., Jögi, A., Grynfeld, A., Pålman, S., & Axelson, H. (2000). HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 274, 22–31.

- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2059–2072.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 17, 45–51.
- Popat, S., & Houlston, R. S. (2005). A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *European journal of cancer (Oxford, England 1990)*, 41, 2060–2070.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28, 1057–1068.
- Pujadas, G., Felipe, F., Ejarque, M., Sanchez, L., Cervantes, S., Lynn, F. C., Gomis, R., & Gasa, R. (2011). Sequence and epigenetic determinants in the regulation of the Math6 gene by Neurogenin3. *Differentiation; research in biological diversity*, 82, 66–76.
- Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R., & Murre, C. (1993). A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 13, 792–800.
- Ross, M. D., Martinka, S., Mukherjee, A., Sedor, J. R., Vinson, C., & Bruggeman, L. A. (2006). Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, 235, 3102–3109.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science (New York, N.Y.)*, 272, 1023–1026.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Müller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science (New York, N.Y.)*, 262, 1731–1734.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239, 487–491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463–5467.

Sendler, A. (2006). *Gastrointestinale Tumoren: [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]*. (7. Aufl.). Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. München: Zuckschwerdt.

Smith, S. B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S. C., & German, M. S. (2003). Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *The Journal of biological chemistry*, 278, 38254–38259.

Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2010). *TNM classification of malignant tumours*. (7th ed.). Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Sommer, L., Ma, Q., & Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Molecular and cellular neurosciences*, 8, 221–241.

Su, L. K., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science (New York, N.Y.)*, 262, 1734–1737.

Suh, K. S., Crutchley, J. M., Koochek, A., Ryscavage, A., Bhat, K., Tanaka, T., Oshima, A., Fitzgerald, P., & Yuspa, S. H. (2007). Reciprocal modifications of CLIC4 in tumor epithelium and stroma mark malignant progression of multiple human cancers. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 121–131.

Tate, P. H., & Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current opinion in genetics & development*, 3, 226–231.

Thayer, M. J., & Weintraub, H. (1990). Activation and repression of myogenesis in somatic cell hybrids: evidence for trans-negative regulation of MyoD in primary fibroblasts. *Cell*, 63, 23–32.

Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature genetics*, 13, 343–346.

Thibodeau, S. N., Bren, G., & Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)*, 260, 816–819.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350–4354.

Vié, N., Copois, V., Bascoul-Mollevis, C., Denis, V., Bec, N., Robert, B., Fraslou, C., Conseiller, E., Molina, F., Larroque, C., Martineau, P., Del Rio, M., & Gongora, C. (2008). Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Molecular cancer*, 7, 14.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2002). *The genetic basis of human cancer*. (2. ed.). New York: McGraw-Hill.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., & White, R. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science (New York, N.Y.)*, 244, 207–211.

Voronova, A., & Baltimore, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4722–4726.

Watada, H., Scheel, D. W., Leung, J., & German, M. S. (2003). Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *The Journal of biological chemistry*, 278, 17130–17140.



Williams, S. J., Gotley, D. C., & Antalis, T. M. (2001). Human trypsinogen in colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 93, 67–73.

Wittekind, C., & Meyer, H.-J. (2010). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. (7. Aufl.). Weinheim: Wiley-Blackwell.

Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., & Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell*, 133, 340–353.

Yao, J., Zhou, J., Liu, Q., Lu, D., Wang, L., Qiao, X., & Jia, W. (2010). Atoh8, a bHLH transcription factor, is required for the development of retina and skeletal muscle in zebrafish. *PloS one*, 5, e10945.

Yoo, S.-H., Ko, C. H., Lowrey, P. L., Buhr, E. D., Song, E.-j., Chang, S., Yoo, O. J., Yamazaki, S., Lee, C., & Takahashi, J. S. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2608–2613.

Zervos, A. S., Gyuris, J., & Brent, R. (1994). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell*, 79, following 388.

Zhao, G. Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M. G., & Crombrugghe, B. de (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Molecular and cellular biology*, 13, 4505–4512.

Zur Lage, P. I., Powell, L. M., Prentice, D. R. A., McLaughlin, P., & Jarman, A. P. (2004). EGF receptor signaling triggers recruitment of Drosophila sense organ precursors by stimulating proneural gene autoregulation. *Developmental cell*, 7, 687–696.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AD	Aktivierungsdomäne
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
kb	Kilobasen
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunden

## 8.2 Primertabellen

	Primername	Primersequenz
<b>Klonierungsprimer</b>		
Expressionskonstrukte	ATOH8_ATG_FW	5'agctcggatccaccatgaagcacatcccggctct3'
	ATOH8_noTag_RV	5'gcataggaattcctccttgcgcttcttctg3'
	NGN3_ATG_FW	5'agctcggatccaccatgacgcctcaac3'
	NGN3_noTag_RV	5'gcataggaattccagaaaatctgaga3'
Promotorkonstrukte	ATOH8_2227nt_FW	5'gttcacgaagggtgaggaa3'
	ATOH8_2227nt_RV	5'ccgaggagtctctggctct3'
	ATOH8_1483nt_FW	5'caaggagtgaagccctgttc3'
	ATOH8_1483nt_RV	5'ccgaggagtctctggctct3'
	ATOH8_1145nt_FW	5'ccacagctaccatttgacga3'
	ATOH8_1145nt_RV	5'gaccgggatgtgcttgat3'
	ATOH8_562nt_FW	5'agcgccccgactagagta3'
	ATOH8_562nt_RV	5'gaccgggatgtgcttgat3'
ATOH8 562nt Mutanten	Ebox1m_FW	5'ggcggcgagcatcccgggcgag3',
	Ebox1m_RV	5'ctcgccccgggatgctgcgccgcc3'
	Ebox2m_FW	5'cgccggcgcccgccagcattttgaaaaatgcttc3'
	Ebox2m_RV	5'ggaagcattttcaaaaatgctg ggccgccggccg3'
	EboxAm_FW	5'tgaggctaaacaaacacagcatgagcgcagcgggcgttc3'

	EboxAm_RV	5'gaacgcccgcgctcgctcatgctgtgtttgtag cctca3'
	EboxBm_FW	5'ggaggcagcgacttcagcatac actctgagcgctcca3'
	EboxBm _RV	5'cggagcgctgagagtgtatgctgaagtcgct gcctcc3'
<b>qRT-PCR Primer</b>		
	AQP3_FW	5'attgcgggtgtcttcgtgta3'
	AQP3_RV	5'ggccagcttcacattctctt3'
	S100P_FV	5'aagggtgctgatggagaagga3'
	S100P_RV	5'gcagccacgaacactatgaa3'
	KISS1R_FW	5'ctcgctggtcatctacgtca3'
	KISS1R_RV	5'cacaggaggaaggtcacgtc3'
	PRSS2_FW	5'tggggcaacactctgagttc3'
	PRSS2_RV	5'aggaagcccacacagaacat3'
	TIMP3_FW	5'ggggaagaagctggtaaagg3'
	TIMP3_RV	5'ccacagagactctcggaagc3'
	SESN2_FW	5'ggagaggagcagaggagag3'
	SESN2_RV	5'gtgtctactcgccccagagg3'
	HBEGF_FW	5'caaggggctaggaagaaga3'
	HBEGF_RV	5'ccatgacacctctctccat3'
	CLIC4_FW	5'aggacaaagagcccctcatc3'

	CLIC4_RV	5'ctggctccttttcaggtca3'
	PSAT1_FW	5'gccgcactcagtggttta3'
	PSAT1_RV	5'tggcaaaatctgatgacctg3'
	RASSF6_FW	5'atcagagcgtctctccagca3'
	RASSF6_RV	5'gggtcctgtccagctcacta3'
	JDP2_FW	5'gtggaggagctgaaatacgc3'
	JDP2_RV	5'ccttttcctt cgctcctctt3'
	MKX_FW	5'gacaacctcggcctgagac3'
	MKX_RV	5'ggtgtgcacggtgctgtaa3'
	ATOH8_FW	5'cctcctcctgagatcaaagc3'
	ATOH8_RV	5'ccagtttgacagcttctgc3'
	XBP_FW	5'ggagttaagacagcgttg3'
	XBP_RV	5'ctgcagagggtgcacgtatgc3'
	NUPR1_FW	5'cacctcccaccagcaac3'
	NUPR1_RV	5'atgggccaggctatagagg3'
	ZNF238_FW	5'ttcgctctcctgcttgaat3'
	ZNF238_RV	5'tgctagcacgtcttcaatgg3'
	MUC20_FW	5'cttctctgctgggaggttg3'
	MUC20_RV	5'tctgtgtcgtccggtgtcat3'

	ITF2B_FW	5'tccctatgaccacatgacca3'
	ITF2B_RV	5'ctggtggcaaccctgtaagt3'
	GAPDH_FW	5'accacagtccatgccatcac3'
	GAPDH_RV	5'tccaccaccctgttgctgta3'
<b>ChIP Primer</b>		
	ATOH8-ChIP_A_FW	5'cgaactgggcttctgtgtaa3'
	ATOH8-ChIP_A_RV	5'ccgaggagtctctggctct3'
	ATOH8-ChIP_Ktr_FW	5'gggagagcaacagagagtgg3'
	ATOH8-ChIP_Ktr_RV	5'aaggggtctggaaaggaatg3'
<b>Screening- und Sequenzierungsprimer</b>		
	pGL3basic_FW (GLprimer2)	5'ctttatgttttggcgtctcca3'
	pGL3basic_RV (RVprimer3)	5'ctagcaaaataggctgtccc3'
	pcDNA3_FW (T7)	5'taatacgactcactatagg3'
	pcDNA3_RV (Sp6)	5'catttaggtgacactatag3'
	pRTS1_sequ_FW	5'ggggatcctctagtcagcaa3'
	pRTS1_sequ_RV	5'aatcaaggggtcccaaactc3'

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor F.T. Kolligs für die Überlassung des Themas, die wertvolle Unterstützung bei der Bearbeitung und insbesondere auch die Schaffung einer sehr angenehmen zwischenmenschlichen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Bei Herrn PD Dr. rer. nat. Andreas Herbst möchte ich mich herzlich für die großartige Betreuung und das weit über das normale Maß hinausgehende Engagement und die ständige Ansprechbarkeit und Erreichbarkeit bedanken.

Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Andrea Ofner für die Einführung in die Methodik und die immerwährende Geduld bei offenen Fragen.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Mitdoktoranden, im besonderen Benjamin Hirschi, der mit seinem Ideenreichtum und seiner Erfahrung an der Bewältigung so mancher methodischer Hürde maßgeblich beteiligt war und immer für gute Stimmung im Labor gesorgt hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinem Lebensgefährten Klaus Kriening, für die ständige emotionale Unterstützung und Motivation und das weitreichende Verständnis für den zuweilen hohen Zeitaufwand meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

## Lebenslauf

**Bernadette Sarah Ströhle**

Geboren am 10.08.1984 in Ulm a.d. Donau

### **Schulzeit**

---

09/1991 – 07/1995	<b>Grundschule, Gerstetten</b>
09/1995 – 07/2004	<b>Hellenstein-Gymnasium, Heidenheim an der Brenz</b> Abschluss: Abitur (Note 1,0)
07/2001 – 07/2002	<b>Austauschjahr an der Battle Mountain High School</b> <b>Vail, Colorado, USA</b>

### **Studium**

---

10/2005 – 9/2007	<b>Studium der Humanmedizin - Vorklinischer Abschnitt</b> <b>Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg</b> Abschluss: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
10/2007 – 05/2012	<b>Studium der Humanmedizin - Klinischer Abschnitt</b> <b>Ludwig-Maximilians-Universität, München</b> Abschluss: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0) <b>Praktisches Jahr</b>
12/2011 – 04/2011	Frauenklinik, Klinikum Starnberg, Starnberg
04/2011 – 07/2011	Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Victoria Hospital, Kapstadt, Südafrika
08/2011 – 12/2011	Lehrkrankenhäuser der Harvard Medical School, Boston, USA

### **Berufstätigkeit**

---

Seit 09/2012	Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Klinikum Augsburg, Augsburg
--------------	--

### **Promotion**

---

02/2009 – 08/2012	Doktorandin in der AG für gastrointestinale Tumorforschung Med. Klinik II, Klinikum Großhadern, München Leitung: Prof. Dr. med. F.T. Kolligs <i>„Identifikation von Zielgenen des <math>\beta</math>-Catenin regulierten 18q21 Tumorsuppressorkandidaten ITF-2“</i>
09/2010	Posterpräsentation bei der 65. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS): <i>„ATOH8 ist ein Zielgen des 18q21 Tumorsuppressors ITF-2“</i> Ströhle B.1, Kourkoulos G.1, Herbst A.1, Ofner A.1, Blum H.2, Thieme S.2, Kolligs F.T.1 1Klinikum der Universität München, Med. Klinik II, Campus Großhadern, München, Germany, 2Universität München, Genzentrum, München, Germany